

PHYSIOLOGISCHES UND PATHOLOGISCHES
ERSCHEINUNGSBILD
DES INTER-ALPHA-TRYPSININHIBITORS
UND SEINER SÄURELABILEN DERIVATE
IN DER ZWEIDIMENSIONALEN
IMMUNELEKTROPHORESE
NACHWEIS EINES GESTEIGERTEN ABBAUS
DES INTER-ALPHA-TRYPSININHIBITORS
BEI VERSCHIEDENEN ERKRANKUNGEN

Alexander Deiler

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Biochemischen Laboratorium (Leitung: Prof. Dr. K. Hochstraßer)
der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann

PHYSIOLOGISCHES UND PATHOLOGISCHES ERSCHEINUNGSBILD
DES INTER- α -TRYPSININHIBITORS UND SEINER SÄURE-
LABILEN DERIVATE IN DER ZWEIDIMENSIONALEN IMMUN -
ELEKTROPHORESE
NACHWEIS EINES GESTEIGERTEN ABBAUS DES INTER- α -
TRYPSININHIBITORS BEI VERSCHIEDENEN ERKRANKUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alexander Deiler
aus
München

1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. Hochstraßer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. H. Naumann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.1979



Meinen Eltern
mit herzlichem Dank
gewidmet

Inhaltsübersicht

	Seite
I. ABKÜRZUNGEN	III
II. EINLEITUNG	1
III. ALLGEMEINER TEIL	3
1. Proteine und ihre Enzyme	3
2. Die Proteinase-Inhibitoren	3
3. Hemmechanismus der Inhibitoren	3
4. Proteinase-Inhibitoren im Blut	5
5. Die Proteinase-Inhibitoren des Blutes bei Erkrankungen	6
IV. SPEZIELLER TEIL	8
1. Der Inter- α -Trypsininhibitor	8
2. Ein säurestabiler Proteinase-Inhibitor im Blut	9
3. Der Inter- α -Trypsininhibitor als Precursor des säurestabilen Inhibitors	9
4. Der säurestabile I-30 bei pathologischen Zuständen	12
5. Die säurelabilen Bruchstücke des Inter- α -Trypsininhibitors	13
6. Das Kallikrein als physiologisches "liberating enzyme"	14
V. ERGEBNISSE	16
1. Identifizierung der säurelabilen Derivate - Normalwerte	16

	Seite
2. Pathologische Befunde	22
2.1. Nephropathien im Stadium der kompensierten Retention	22
2.2. Nephropathien mit chron. Niereninsuffizienz und Hämodialyse	23
2.3. Patienten mit Sepsis und Schock	28
2.4. Patienten mit Präshock und Infarkt	29
2.5. Patienten mit Leberinsuffizienz und Leberkoma	29
2.6. Patienten mit Lebercirrhose	30
2.7. Patienten mit chron. Pankreatitis	30
2.8. Patienten mit Hepatitis	37
2.9. Patienten mit verschiedenen Entzündungen	37
2.10. Krankheiten mit normalem Verteilungsmuster	41
2.11. Patienten mit Neoplasien und unauffälligem ITI-Verteilungsbild	41
2.12. Patienten mit Neoplasien und verändertem ITI-Verteilungsbild	41
2.13. 15 % Verbrennungen	44
VI. DISKUSSION	45
VII. MATERIAL UND METHODEN	48
1. Aufstellung des verwendeten Materials	48
2. Praktisches Vorgehen	48
2.1. Anfertigung der zweidimensionalen Immunelektrophorese	48
2.2. Anfertigung der eindimensionalen Immunelektrophorese	50
VIII. ZUSAMMENFASSUNG	52
Literaturverzeichnis	53

I. ABKÜRZUNGEN

AS	=	Aminosäure
ATA	=	Antitryptische Aktivität
α_1 -AT	=	α_1 -Antitrypsin
α_2 -MG	=	α_2 -Makroglobulin
ITI	=	Inter- α -Trypsininhibitor
I-30	=	Säurestabiler Proteinase-Inhibitor, freigesetzt aus dem Inter- α -Trypsininhibitor
MG	=	Molekulargewicht
SLD	=	Säurelabile Derivate des Inter- α -Trypsininhibitors (D. 1, D. 2)
1d-ImE.	=	Eindimensionale Immunelektrophorese nach Laurell
2d-ImE.	=	Zweidimensionale Immunelektrophorese nach Stephan u. Frahm

II. EINLEITUNG

Erste Beobachtungen einer gewissen Enzym-Hemmkapazität im Organismus wurden 1894 von Fermi u. Pernossi, etwa zur selben Zeit auch von Röden gemacht. (15) 1900 berichtete Landsteiner über die Konzentrierung der antitryptischen Aktivität (ATA) durch Salz-Fraktionierungsvorgänge in der Albuminfraktion. (39) Hedin, Wiens u. Eisner waren der Ansicht, daß es sich hierbei um Antikörper - ähnliche "Antienzyme" handeln müsse und schrieben ihnen Lipoidcharakter zu. (22, 64, 13) Erste nähere Charakterisierungen gelangen in den Dreißiger Jahren.

Im menschlichen Blut vermutete man zwei trypsinhemmende Faktoren, die Jacobsson 1953 zu 90 % in der α_1 -Globulin-Fraktion und zu 10 % in der α_2 -Fraktion fand. (32) Schultze gelang es 1962 in den Behringwerken den von Jacobsson bestimmten Hauptbestandteil der antitryptischen Aktivität (ATA) des Serums als ein α_1 -3,5 S-Glykoprotein und als wichtigsten Serum-Trypsininhibitor zu identifizieren - daher α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT). (52) Vier Jahre später konnten Heimbürger, Schwieck u. Haupt mit Hilfe von Stärkegel-Elektrophorese auf fibrinhaltigen Platten vier weitere Proteinase-Inhibitoren nachweisen. (24, 25)

Die Tatsache, daß auch nach Enteiweißung noch eine geringe Menge an ATA im Serum verbleibt, veranlaßte Astrup u. Shulman auf das Vorhandensein eines säurestabilen Proteinase-Inhibitors in Serum und Urin des Menschen hinzuweisen. (2, 50, 3) 1973 isolierte Hochsträßer durch Affinitätschromatographie zunächst zwei säurestabile Inhibitoren, wobei sich später der zweite als weitere Abbaustufe des ersten erwies. (28) 1972 bereits hatte Proksch von der immunologischen Kreuzreaktion eines säurestabilen Urin-Inhibitors ("Meningin") mit dem ITI des Serums berichtet. (45)

1976 gelang es Hochstraßer in vitro durch Trypsin sowohl aus ITI wie aus dem säurestabilen Inhibitor I-30 ein identisches Inhibitor - molekül I-14 freizusetzen und damit den ITI als Precursor des säurestabilen Serum- u. Urin-Inhibitors zu definieren. (31) Als mögliches physiologisches "liberating enzyme" in vivo wurde von Bretzel 1976 Kallikrein in die Diskussion eingeführt. (7)

Bei der Freisetzung des I-30 aus dem ITI entstehen neben diesem auch ein, möglicherweise zwei säurelabile Derivate, deren Präzipitatflächen in der zweidimensionalen Immunelektrophorese mit einem Anstieg der I-30 Konzentration im Serum bei pathologischen Zuständen zunehmen.

Während in einer Parallelstudie die Konzentration des I-30 derselben Seren untersucht wurde (Zeitlmann, unveröffentlicht), versucht diese Arbeit die Theorie eines verstärkten ITI-Abbaus bei verschiedenen Erkrankungen mit Hilfe des Erscheinungsbildes des ITI und seiner säurelabilen Derivate (SLD) in der zweidimensionalen Immunelektrophorese zu erhärten.

III. ALLGEMEINER TEIL

1. Proteine und ihre Enzyme

Proteine sind, zumindest bei allen höheren Lebewesen, die quantitativ am stärksten beteiligten Bausteine der lebenden Substanz. Ein großer Teil der zellgebundenen Proteine sind Enzyme, die z. T. in löslicher, z. T. in strukturgebundener Form vorliegen und neben dem Auf- u. Abbau von Eiweißen für einen geordneten Ablauf sämtlicher Biofunktionen notwendig sind. (8) Unter Proteinasen versteht man Enzyme, die die hydrolytische Spaltung der Peptidbindungen der Proteine katalysieren. Bis zu ihrer Umwandlung vom Proenzym zum Enzym ist nicht selten eine ganze Reihe kaskadenförmig ablaufender Reaktionen erforderlich. Auf Grund ihrer Wirkung an den Aminosäuren werden sie in der systemat. Nomenklatur unter die CN-Hydrolasen eingereiht. Je nach Lage ihres Angriffsortes am Gesamtprotein unterteilt man sie in die Gruppe der Endopeptidasen od. Proteinasen und die der Exopeptidasen od. Peptidasen. (8, 34)

2. Die Proteinase-Inhibitoren

Angesichts der essentiellen Aufgaben der Enzyme ist es nicht überraschend, neben dem bereits erwähnten komplizierten Kaskaden-Mechanismus ein zweites Sicherungssystem gegen eine überschießende Aktivität der Proteinasen zu finden. Überall, wo Proteinasen in einem Organismus vorkommen, sind auch ihre natürlichen Antagonisten, die Proteinase-Inhibitoren anzutreffen. Es gibt sowohl niedermolekulare säure- u. thermostabile Polypeptide wie auch hochmolekulare labile Proteine, die in der Lage sind, die katalytischen Aktivitäten dieser

Enzyme in reversibler Weise zu hemmen. Die ehemals verwendete Bezeichnung "Antienzym" für Proteinase-Inhibitoren war insofern falsch, als es sich bei diesen um einzelne, nach spezieabhängigem Code angelegte Proteine handelt, deren Auftreten nicht von einer vorausgehenden Immunisierung abhängig ist. (59)

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen zwei Gruppen:

Kunitz u. Northrop isolierten 1936 den ersten Trypsin-, Chymotrypsin-, Plasmin-Inhibitor aus Rinderpankreas. (38) Daher versteht man heute unter Inhibitoren vom "Kunitz-Typ" solche, die auf Grund ihrer AS-Sequenz im aktiven Zentrum ein polyvalentes Hemmspektrum besitzen. Sie finden sich bei Pflanzen und Tieren.

Nur in tierischen (und menschl.) Organismen dagegen kommen die nach ihrem Erstbeschreiber benannten "Kazal-Inhibitoren" vor; sie können nur ein einziges Enzym selektiv hemmen. (35)

In den reaktiven Zentren kann die Hemmwirkung gegen Trypsin entweder von einem Lysin- od. einem Argininrest ausgehen. Je nachdem spricht man von Lysin- od. Arginin-Inhibitoren. Während letztere auch nach der Enzymhemmung noch ihre volle Aktivität behalten können, werden die Lysin-Inhibitoren durch Acylierung einer ϵ -Aminogruppe inaktiviert. (58)

3. Hemmechanismus der Inhibitoren

Der Ablauf der Proteolyse findet in einer Reaktionsfolge durch Komplexbildung zwischen Enzym und Substrat mit anschließender Hydrolyse von AS-Bindungen statt. Sind hierbei die Proteinbruchstücke entstanden, wird die Proteinase wieder freigesetzt. Mit dem Inhibitor bildet die Proteinase ebenfalls einen Komplex. Die anschließende Hydrolyse des Moleküls mit Freisetzung der wiederum aktiven Proteinase kann jedoch nicht erfolgen. Das Enzym bleibt an

den Inhibitor gebunden und für die Spaltung weiterer Proteine blockiert. Zwar kann es während dieser Reaktion in Form einer limitierten Proteolyse des Inhibitors zu einer Hydrolyse der im aktiven Zentrum lokalisierten Peptidbindung kommen; zu einem Verlust der Hemmwirkung kommt es jedoch nicht. (58, 53)

4. Proteinase-Inhibitoren im Blut

Die Isolierung und Charakterisierung der Inhibitoren aus menschlichen Drüsensekreten und Blutserum sowie die Erkenntnis ihrer Funktionen waren von besonderem Interesse. Besitzen sie doch die Fähigkeit neben den physiologischen Enzymen wie Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, Plasmin und Thrombin auch die Proteinasen aus zerfallenden Leukozyten, Bakterien und Pilzen in ihrer Aktivität zu blockieren. Desweiteren kontrollieren diese Inhibitoren eine Vielzahl proteolytisch regulierter Prozesse im Blut, wie Blutgerinnung, Fibrinolyse, Kininfreisetzung und Komplementbildung. (27) Vermutete Jacobsson 1953 ursprünglich zwei trypsinhemmende Faktoren im Blut, so gelang es Schultze 1962 als Hauptbestandteil der Serum-ATA das α_1 -AT als α_1 -3,5S-Glykoprotein zu identifizieren. (32, 52) Heimbürger, Schwieck u. Haupt fanden 1966 mit Hilfe der Stärkegel - Elektrophorese auf fibrinhaltigen Platten weitere Proteinase-Inhibitoren. (24, 25) Bisher sind sechs säurelabile Proteinase-Inhibitoren bekannt: α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin, α_1 -Antichymotrypsin, Antithrombin III, C1-Inaktivator und der Inter- α -Trypsin-Inhibitor. (27)

5. Die Proteinase-Inhibitoren des Blutes bei Erkrankungen

Bekanntlich gehen viele Krankheitsbilder mit einer Verschiebung des Proteingehaltes in den elektrophoretischen Serumfraktionen einher. Eine Veränderung der Konzentration der α_1 -Globulin-Fraktion wird, da diese zum größten Teil aus α_1 -AT besteht und 90 % der trypsinhemmenden Wirkung des Serums besitzt, eine meßbare Veränderung der Hemmkapazität nach sich ziehen. Bei verschiedenen Krankheiten wurde erstmalig von Ascoli u. Bezolla 1903 und von Gräfenberg 1909 eine Veränderung in der Inhibitorkonzentration berichtet. (1, 20) Neben Ganrot und Küppers (18, 37) führten in jüngerer Zeit auch Schön und Kemp solche Inhibitormessungen durch. (51, 36) Hier zeigte sich besonders nach großen chir. Eingriffen, nach Myocardinfarkt, bei malignen Erkrankungen und bei entzündlichen Reaktionen ein erheblicher Anstieg der α_1 -AT-Aktivität. Bei nephrotischen Erkrankungen kommt es neben einem Abfall des α_1 -AT zu einem Anstieg des α_2 -Makroglobulin (α_2 -MG). (59) Eine Veränderung der Hemmwirkung des Serums gegenüber Kallikrein wurde von Vogel und Mitarb. beobachtet. Dabei kann die Kallikrein-Hemmung unabhängig vom Trypsin-Inhibitorspiegel bei chir. Eingriffen erhöht sein. (62) Das Interesse an der Bedeutung des α_1 -AT nahm noch zu, als Laurell u. Eriksson 1963/65 die Beobachtung machten, daß familiär gehäufte und genbedingt niedrige α_1 -AT-Konzentrationen mit einem chronisch obstruktiven Lungenemphysem in Verbindung stehen. (42, 14) Durch das Fehlen des α_1 -AT wird die Zerstörung von elastischem Lungengewebe durch leukozytäre Proteasen vor allem aus polymorphkernigen Granulozyten und Makrophagen ermöglicht. (33) Eine weitere Veränderung im Serumspiegel kann man beim C1-Esterase-Inhibitor finden. Seine physiologische Rolle wurde offensichtlich, als ein ursächlicher Zusammenhang zwischen angioneurotischem Ödem und C1-Inhibitor bei erheblichem Mangel dieses Proteins erkannt wurde. (11, 48)

Das Antithrombin III ist nach abgelaufener Koagulation in vitro und in vivo teilweise verbraucht. Wie immunologische Methoden zeigten, bildet es mit Thrombin einen Komplex. (54, 26) Eine Abnahme an AT III weist somit auf einen hyperkoagulopathiven, bzw. prothrombotischen Zustand hin. Bei Familien mit erblich bedingter AT III-Verminderung auf ca. 50 % der Norm fand sich ein erhöhtes Vorkommen thromboembolischer Erkrankungen. Ein Abfall des AT III unter normale Werte stellte sich auch bei Patientinnen nach Östrogen/Gestagen-Therapie ein. (27) Von einem Mangel an α_2 -MG wurde noch nichts berichtet. Eine Zunahme fand man indes bei Diabetes mellitus und bei verschiedenen Zuständen, die mit dem Wachstum, besonders während Kindheit und Schwangerschaft, im Regenerations-Stadium und bei Tumoren verbunden waren. (18, 19, 54) Bedenkt man in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß das α_2 -MG nicht nur proteolytische Enzyme hemmen kann, sondern auch gegenüber Proteohormonen, wie z.B. dem Wachstumshormon, eine große Affinität aufweist, so werden diese Konzentrationsänderungen verständlicher. (27)

IV. SPEZIELLER TEIL

1. Der Inter- α -Trypsininhibitor

1965 wurde von Heide, Heimbürger u. Haupt ein Protein mit den Eigenschaften des vier Jahre zuvor von Steinbuch beschriebenen π -Proteins isoliert und als Inhibitor identifiziert. (55, 23)

Ließen sich mit Hilfe der Fibrin-Agar-Elektrophorese die Hauptbestandteile der ATA des menschl. Serums in der α_1 - und α_2 -Globulinzone - als α_1 -AT und α_2 -MG - nachweisen, so fand man in Verbindung mit der Stärkegel-Elektrophorese zwischen diesen einen weiteren Trypsin-Inhibitor. Gemäß seiner Lokalisation wurde er als Inter- α -Trypsininhibitor (ITI) bezeichnet.

Die chemische Analyse ergab ein Glykoprotein mit über 90 %igem Proteinanteil und ca. 8,4 % Kohlenhydraten. Er ist in der Lage, bei einem Normalserumgehalt von 10-30 mg% pro mg Inhibitor je nach Herkunft 0,15-0,20 mg Trypsin zu inaktivieren. Bereits bei den ersten Untersuchungen fiel seine erhebliche Säurelabilität und Dissoziationstendenz auf. So erhielten die Autoren bei der Aufbereitung des ITI neben der natürlichen Komponente mit einer Sedimentationskonstanten von $S_{20w}^1 = 6,4$ S Fragmente mit $S = 4,4$ S. In der Stärkegel-Elektrophorese zeigten die Fragmente eine größere Beweglichkeit als der ITI, was auf ein leichteres MG schließen ließ. Durch Kombination von Gel-Elektrophorese und Immunodiffusion zeigte es sich, daß die beiden Komponenten ein identisches Immunpräzipitat mit monovalentem ITI-Antiserum v. Kaninchen bildeten. Das Fragment mit $S = 4,4$ S dissoziierte in eine Proteinkomponente, die keine Inhibitoraktivität aufwies und in ein Inhibitorpeptid. Mit Ausnahme der nur geringen und spezifischen Hemmung von Trypsin konnte dem ITI bisher keine physiologische Bedeutung zugeschrieben werden.

2. Ein säurestabiler Proteinase-Inhibitor im Blut

Erste Anzeichen für einen säurestabilen Inhibitor im Blut fanden Peanasky u. Laskowsky 1953 und weiters Astrup und Shulman. (44, 3, 50) Nach Enteiweißung verbleiben im Blutplasma bis zu 3 % der ursprünglich vorhandenen hohen ATA. Durch Affinitäts-Chromatographie gelang es Hochstraßer 1973 sowohl aus enteiweißtem Plasma wie auch aus nativem Humanserum zwei Proteinase-Inhibitoren zu isolieren. (28) Ihr MG wurde mit 65000 (real 44000) und 22000 (real 17000) angegeben. Beide wiesen eine immunologische Kreuzreaktion mit dem ITI auf. Zwei weitere säurestabile Inhibitoren wurden in den Sekreten des Bronchialtraktes dargestellt. Während ein Zusammenhang zwischen diesen und den Serum-Inhibitoren von Tisowsky u. Hochstraßer (1975) verneint werden mußte (58), fand sich ein drittes Paar an säurestabilen Inhibitoren im Harn, deren Identität mit den Serum-Inhibitoren auf Grund der AS-Zusammensetzung, der elektrophoretischen Beweglichkeit und der immunologischen Kreuz-Antigenität bewiesen wurde. (31) Der Betrag der normalerweise im Serum nach Enteiweißung auffindbaren ATA liegt zwischen 5 - 10 mIU/ml mit einem Maximum bei 7 - 8 mIU/ml. (29)

3. Der Inter- α -Trypsininhibitor als Precursor des säurestabilen Inhibitors

Die im enteiweißten Überstand verbleibende ATA erhöht sich nach Inkubation des Serums mit Trypsin. Gleichzeitig ist bei diesem Vorgehen ein Absinken der säurelabilen ATA festzustellen (Abb. 2). Das aber bedeutet, daß ein säurestabiler Inhibitor aus einem labilen durch Trypsin freigesetzt werden muß. Bei einem Maximum an freigesetzter Kapazität des säurestabilen Inhibitors findet sich mit immunologischen Methoden kein ITI mehr.

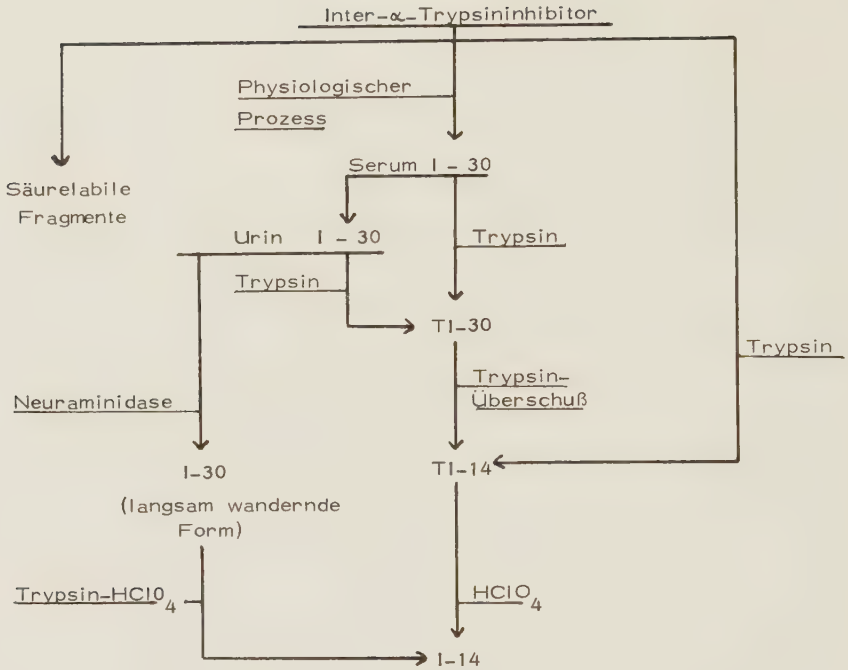


Abb. 1: Abbau-Schema des ITI und Gewinnung des I-14 / nach (31)

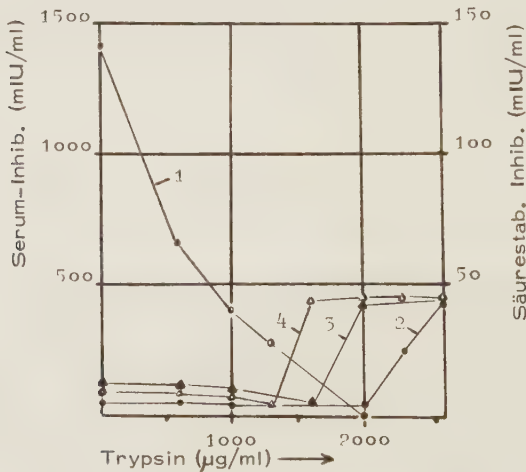


Abb. 2: Abnahme d. säurelabilen (1) u. Zunahme der säure-stabilen (2-4) ATA bei Trypsininkubation / nach (31)

Der nunmehr gefundene Betrag an säurestabiler Hemmaktivität ist nahezu proportional der Menge des Vorläufers in der ITI-Aufbereitung. Eine Verwandtschaft zwischen dem säurestabilen Inhibitor und dem ITI wurde nachgewiesen, als es nach getrennter Trypsininkubation der beiden Anreicherungen über die Bildung von Trypsinkomplexen und nach anschließender Behandlung mit Trypsin-Überschuß zur Freisetzung eines identischen stabilen Inhibitors mit einem MG von 14000 kam (Abb. 1). Aus den gemeinsamen Endprodukten bei der Verfahren konnte von Hochstraßer geschlossen werden, daß der ITI der Vorläufer des säurestabilen Inhibitors ist. Das MG des in freier Form im Serum vorliegenden Inhibitors wurde mit 30000 bestimmt. Das durch Gelfiltration ursprünglich erhaltene MG von 65000 ist auf einen hohen KH-Gehalt zurückzuführen. Bei der Freisetzung des neuen Inhibitors I-30 aus dem ITI entstehen neben diesem noch weitere säurelabile Bruchstücke (SLD) ohne bedeutende Hemmkapazität. Da das aus ITI und I-30 entstehende Abbauprodukt I-14 die selben Hemmeigenschaften wie der native I-30 besitzt, kann man annehmen, daß das antitryptische Zentrum in einem relativ kleinen und sehr stabilen Areal lokalisiert ist, das sowohl der Enteiweißung wie auch dem Trypsinüberschuß widersteht. Die AS-Sequenzierung durch Hochstraßer ergab, daß nach Abspaltung des für die Hemmwirkung nicht essentiellen Molekülteiles ein Inhibitormolekül verbleibt, das aus zwei miteinander kovalent verbundenen Domains besteht, die untereinander und zu den bekannten Inhibitoren vom "Kunitz-Typ" große Homologien zeigen.

Der I-30 ist bis heute das erste Beispiel eines Inhibitors, der nicht direkt in Sekretdrüsen oder Schleimhäuten synthetisiert wird, sondern aus einem Proinhibitor freigesetzt wird. Da er glomerulär sezerniert wird, erhebt sich die Frage nach einer möglichen Schutzfunktion für die harnableitenden Organen. Bemerkenswert ist noch die Erweiterung des Hemmspektrums des I-30. Gegenüber seinem Precursor

mit selektiver Trypsinhemmung vermag der I-30 noch schwach Chymotrypsin und sehr schwach Plasmin zu hemmen. (31)

4. Der säurestabile I-30 bei pathologischen Zuständen

Gegenüber einem Vergleichskollektiv von Gesunden mit einer Konzentration von 5 – 10 mIU/ml zeigten Patienten mit Nephropathien verschiedener Genese eine eindeutige, proportional zum Serum-Kreatininspiegel ansteigende Konzentration an I-30. Da die Inhibitorerhöhung, zumal auch im Bereich der oberen Grenzwerte der Kreatininkonzentration, um ein Wesentliches eindeutiger nachzuweisen ist (um das Zwei- bis Dreifache der Norm), wurde die Bestimmung des I-30-Spiegels auch als einfach durchführbare Methode zur Früherkennung von Abstoßungskrisen nach Nierentransplantationen vorgeschlagen. (30, 16) Anhand dieser Methode war bereits 24–48 Stunden vor einer manifesten Einschränkung der Kreatinin-Clearance durch Anstieg der I-30-Konzentration eine negative Prognose für das Nierentransplantat zu stellen. Als weitere bisher gefundene pathologische Zustände mit einem erhöhten I-30-Spiegel im Blut erwiesen sich Erkrankungen mit sinubronchialen Symptomen sowie Verbrennungen. (Rasche, Hochstraßer, unveröffentlicht) Da in diesem Zusammenhang oft eine Verminderung der ITI-Konzentration festgestellt werden konnte, vermutet nun Hochstraßer einen gesteigerten Abbau des ITI als Ursache der I-30 Erhöhung. (Hochstraßer, unveröff.)

5. Die säurelabilen Bruchstücke des Inter- α -Trypsininhibitors

Wie bereits angedeutet und aus Abb. 2 ersichtlich, entstehen bei der Freisetzung des säurestabilen I-30 durch begrenzte Proteolyse aus dem Precursor säurelabile Abbauprodukte. Es handelt sich hierbei mindestens um ein, möglicherweise um zwei säurelabile Derivate (SLD) mit unterschiedlichem MG. Das größere der beiden Derivate wird von Hochstraßer mit einem MG von ca. 100.000 angegeben. (Hochstraßer, unveröff.) Eine Anreicherung der SLD als Voraussetzung genauerer Untersuchungen wurde bisher noch nicht unternommen, so daß nur einige spärliche und unsichere Fakten bekannt sind. Zwar werden die AS-Zusammensetzungen derjenigen des ITI ähnlich sein, eine genaue Analyse der einzelnen Bruchstücke aber könnte möglicherweise zusammen mit der AS-Sequenz des I-30 eine exakte Lokalisation der Spaltungsstellen erbringen.

Da beide Abbauprodukte eine wenn auch nur noch schwache immunologische Kreuzreaktion mit ITI-Antiserum aufweisen, lassen sie sich immunoelektrophoretisch darstellen. Bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese (2d-ImE) (nach Stephan u. Frahm, 56) von natürlichem Humanserum - nicht aber nach vorhergehender Enteiweißung - erscheinen sie neben dem ITI-Präzipitat als kleinere, den Hauptpeak z. T. überlagernde Präzipitate. Wenn es sich hierbei, wie angenommen, in der Tat um bei der Liberierung des Säurestabilen aus ITI gleichzeitig freiwerdende SLD handelt, so müssen diese Abbauprodukte bei einer vermehrten I-30-Freisetzung ebenfalls zunehmen. Ihre angewachsene Konzentration wäre also aus größeren Präzipitaten in der 2d-ImE zu ersehen. Durch die Bestimmung dieser Bruchstücke müßten somit zusätzliche Hinweise für die Annahme zu gewinnen sein, daß bei verschiedenen Krankheiten ein gesteigerter ITI-Umsatz abläuft. Ein paralleler Anstieg der SLD in der Elektrophorese und der I-30-Konzentration im Serum wäre ein Beweis für

diese Theorie. Eine Konzentrationserhöhung zumindest des einen Abbauproduktes mit dem MG von 100,000 müßte auch in Fällen nachweisbar sein, bei denen die Bestimmung des ITI-Spiegels oder der Konzentration des I-30 keine Hinweise für den gesteigerten "turn over" liefern.

Dies wäre z.B. der Fall, wenn eine vermehrte Produktion des ITI und ein gleichzeitig gesteigerter ITI-Abbau, verbunden mit einem simultanen Eliminationsanstieg des Säurestabilen, bei Messungen beider im Serum normale Werte vortäuschen würden. Die pathologische Realität eines solchen Zustandes kann also nur durch das vermehrte Auftreten des infolge seines MG nicht frei glomerulär filtrierbaren SLD in der 2d-ImE. nachgewiesen werden.

6. Das Kallikrein als physiologisches "liberating enzyme"

Das Kallikrein als kininliberierendes Enzym wurde in den Dreißiger Jahren von Frey u. Werle entdeckt und als ursächlicher Blutdruckdepressor bekannt, (17) Da erst seit einigen Jahren durch den BAEE-Test eine direkte Kallikrein-Messung möglich ist, ist der tatsächliche Kallikreinspiegel bei pathologischen Zuständen bisher nur spärlich untersucht. Auf Grund indirekter Messungen ist jedoch erwiesen, daß es bei Entzündung und Gewebeschaden durch eine gesteigerte Wirkung auf die Kininogene Symptome wie Gefäßdilatation, Steigerung der kapillären Permeabilität, Leukozytenemigration und Schmerz hervorruft. Auch bei Schockformen jeglicher Genese (anaphylaktisch, Pepton-, endotoxisch u. traumatisch) wurde eine Verminderung des Kininogenspiegels festgestellt. (6, 46, 63) Eine Liberierung von Bradykinin nach thermischen Insulten fand Rocha e Silva. (47) Nach Vogt, Eisen und Buluk ist Plasmin in der Lage, ebenso wie Trypsin, das Präkallikrein zu aktivieren. (60, 61, 12, 9)

Die Möglichkeit einer weiteren Wirkung des Kallikreins im Blut zeigte Bretzel auf, als er Kallikrein als potentiell physiologisches "liberating enzyme" des I-30 aus dem ITI fand. (7) Dies wäre möglich, da Kallikrein im Gegensatz zu Trypsin weder vom ITI selbst noch von den Abbauprodukten gehemmt wird. Bedenkt man allerdings die extreme proteolytische Spezifität des Kallikreins, so erscheint diese Tatsache sehr bemerkenswert. Bisher ist nicht bekannt, wo sich die Spaltung des ITI tatsächlich ereignet. Die Demonstration, daß eines der Kallikreine diese Reaktion katalysieren kann, könnte ein Zeichen für eine Umwandlung im Blut sein. Die Aufrechterhaltung eines gut ausbalancierten niedrigen Spiegels an säurestabilem I-30 ließe sich dadurch erklären, daß die Aktivität des Kallikreins durch die große Menge an α_1 -AT im Serum fast vollständig unterdrückt wird. (7)

Die Beobachtung, daß die Peaks der SLD und des ITI in der 2d-ImE. zusammen mit der Serumkonzentration des säurestabilen Inhibitors eine Veränderung aufweisen, in Verbindung mit der Feststellung, daß Kallikrein diesen Umbauprozess katalysieren könnte, ließ es angezeigt erscheinen, sowohl die Konzentration des I-30, als auch die SLD in der 2d-ImE. zu untersuchen und damit evtl. Parallelen mit einer gesteigerten Kallikrein-Aktivität zu eröffnen. Dieses wurde in zwei getrennten Arbeiten unter Verwendung derselben Ausgangsseren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen unternommen.

Die Konzentration des I-30 wurde von Zeitlmann bestimmt (unveröff.), während sich diese Arbeit mit der Anfertigung und Auswertung von zweidimensionalen Immunelektrophoresen zur Darstellung des ITI und seiner säurelabilen Derivate mit monovalentem ITI-Antiserum v. Kaninchen beschäftigt.

V. ERGEBNISSE

1. Identifizierung der säurelabilen Derivate - Normalwerte

Trennt man unbehandeltes Humanserum von gesunden Versuchspersonen elektrophoretisch auf, und läßt man es anschließend - ebenfalls elektrophoretisch - senkrecht zur vorhergehenden Laufrichtung gegen monovalentes ITI-Antiserum vom Kaninchen diffundieren, so zeigen sich neben dem zu erwartenden Peak des ITI noch zwei weitere Präzipitationsgipfel. Diese sind weiter in Richtung Anode verschoben und überlagern den Peak des ITI zum Teil erheblich. Ihre Präzipitationszonen sind weit schwächer ausgebildet als die des ITI und ihre Anfärbbbarkeit dementsprechend schlecht. Aus dieser antigenetischen Kreuzreaktion ist ersichtlich, daß es sich hierbei um die bereits erwähnten säurelabilen Derivate des ITI handeln muß. Sie werden im weiteren mit D.1 und D.2 bezeichnet.

Geht man davon aus, daß der ITI mit seinem MG von 180.000 das Hauptpräzipitat bildet, so ist D.1 mit einem MG von 100.000 deutlich weiter links in der Laufrichtung gelagert. Dieses diffuse Präzipitat ist sicher mit dem bei der eindimensionalen Elektrophorese von Serum von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen darstellbaren Präzipitat identisch. (Hochstraßer, unveröff.) Wenn man voraussetzt, daß es sich bei dem zweiten Peak wirklich um das D.2 des ITI handelt, ergeben sich Schwierigkeiten mit der Festlegung des D.2-MG, das, stellt man den säurestabilen Inhibitor mit einem MG von 30000 in Rechnung, maximal ca. 46000 betragen kann. Eine Erklärung für die geringe Laufgeschwindigkeit dieses D.2 könnte damit höchstens in einer sehr niedrigen Ladung des Moleküls zu finden sein. Die Menge des I-30 ist dagegen so gering, daß sie sich im Nativpräparat in der 2d-ImE. nicht darstellen läßt, wohl aber nach

vorangegangener Anreicherung im Serum. Sein Präzipitat wäre noch weiter in Richtung Anode zu finden.

Legt man den Präzipitationspeaks Gauß'sche Verteilungskurven zugrunde, und wertet man diese nach photographischer Vergrößerung und planimetrischer Flächenbestimmung aus, so ergibt sich für die drei Präzipitate eine in ihrer Größenordnung gleichbleibende Flächenverteilung.

Die Normalverteilung der Flächen in mm^2 beträgt: (Abb. 3)

$$\text{ITI} : 450 \text{ mm}^2 \pm 150 \text{ mm}^2$$

$$\text{D.1} : 240 \text{ mm}^2 \pm 100 \text{ mm}^2$$

$$\text{D.2} : 40 \text{ mm}^2 \pm 25 \text{ mm}^2 \quad (n = 14)$$

Die parallel dazu durchgeführte eindimensionale Elektrophorese des ITI nach Laurell (1d-ImE.) ergab für gesunde Personen einen Normalwert von 57 mm Höhe $\pm$ 12 mm.

Die auf diese Weise für fast alle Proben parallel durchgeführten Vergleichsbestimmungen des ITI in der 1d-ImE. n.L. beziehen sich jeweils auf ein mitlaufendes Normalserum als Eichwert, dessen Höhe gleich 1,0 gesetzt wurde. Wie aus Abb. 4 hervorgeht, läßt sich aus beiden Bestimmungen für den ITI eine Korrelation von ca. + 0,45 ableiten. Aus dieser Streuung ist bereits die Schwierigkeit einer quantitativen Auswertung dieser Art von Inhibitordarstellung ersichtlich.

Um halbwegs exakt reproduzierbare Ergebnisse der Flächengrößen zu erhalten, wäre es erforderlich, für die gesamte Versuchsserie nur Antiserum mit der gleichen Batch-Nr. zu verwenden.

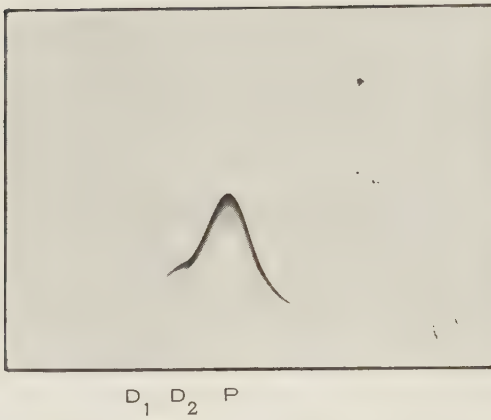
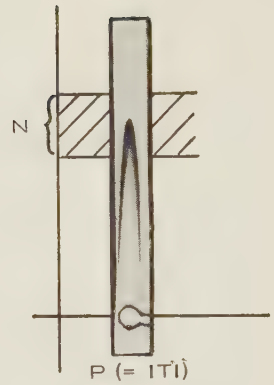


Abb. 3a: 2d-ImE.



N = Streubereich
der Normalseren

Abb. 3b: 1d-ImE.

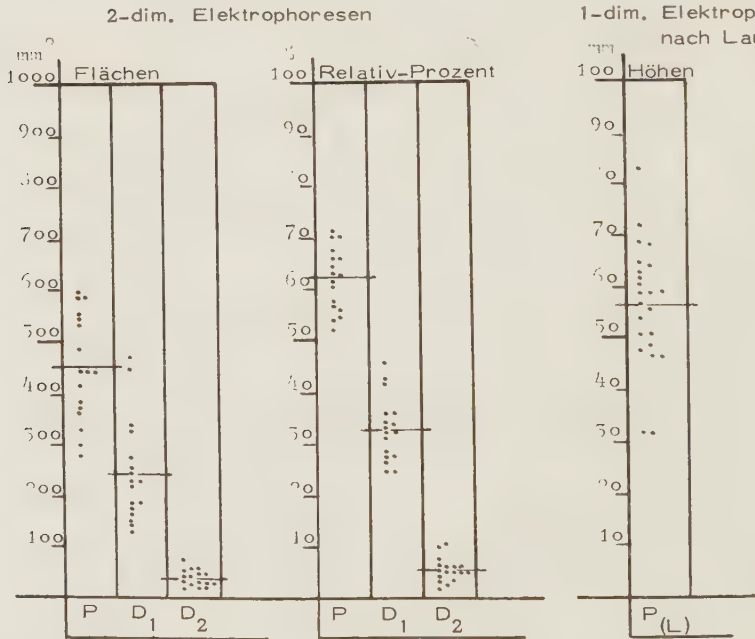


Abb. 3c: n = 14

Abb. 3a-c: Darstellung des ITI-Precursors (P) und seiner Derivate (D_1 , D_2) bei gesunden Personen (Normalwerte)

Dadurch könnte für jede Auftrennung genau die gleiche Antikörper-Trenngel-Menge eingesetzt werden, und die Ergebnisse wären besser reproduzierbar.

Da mir aber nur Antiserum aus verschiedenen Batch-Nr.-Serien zur Verfügung stand und sich infolge dessen die absoluten Flächengrößen nicht immer einheitlich verhielten, habe ich mich entschlossen, neben den absoluten Flächen in mm^2 auch die Flächenprozent-Anteile der einzelnen Präzipitate in Relativprozent anzugeben.

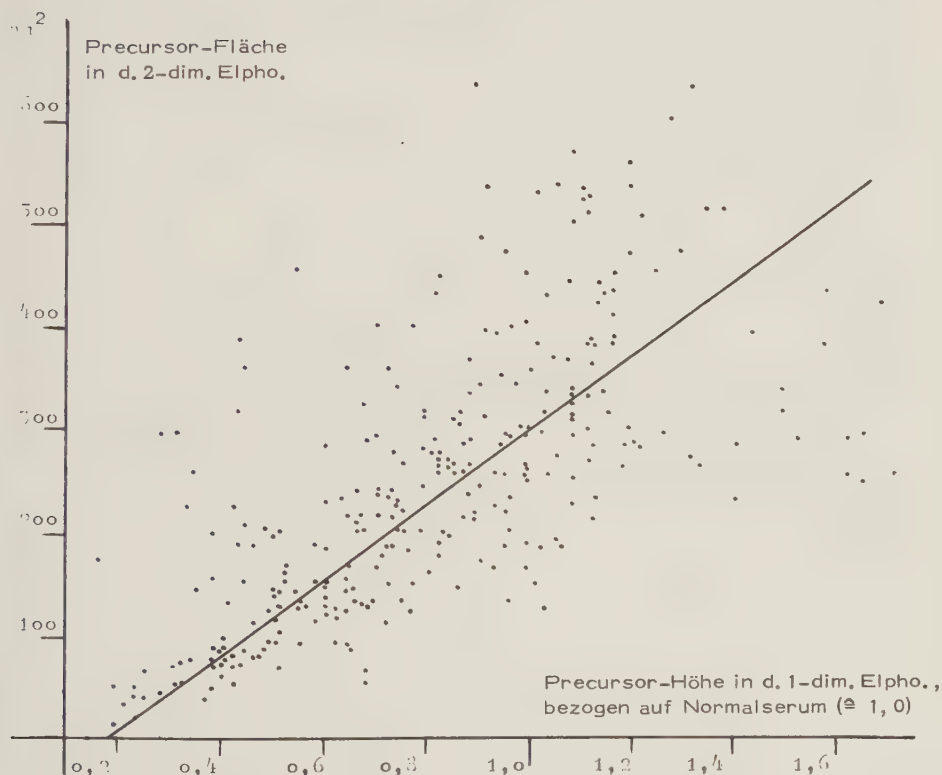


Abb. 4: Korrelation zwischen 2d-ImE.-Fläche u. 1d-ImE.-Höhe des ITI

Durch diese Darstellung in Relativprozent werden einerseits die Flächenunterschiede der einzelnen Elektrophoresen ausgeglichen und der tatsächliche Streubereich verkleinert, andererseits aber führt bei einem solchen Vorgehen eine starke Vermehrung der säurelabilen Derivate automatisch zu einer Verminderung der Flächenprozentage des ITI, obwohl dies nicht ganz den wirklichen Verhältnissen entspricht.

Die Synopsis beider Auswertungsverfahren aber läßt die Tendenz der Verteilung einigermaßen klar erkennen.

Somit ergeben sich für die drei Präzipitate im Normalserum folgende Anteils-Mittelwerte: (Abb. 3)

ITI :	60 %	$\begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix}$	10 %
D. 1:	33 %	$\begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix}$	12 %
D. 2:	5 %	$\begin{smallmatrix} + \\ - \end{smallmatrix}$	5 %

Die starke Überlagerung und schlechte Darstellbarkeit des D. 2 und seine bisher unzulängliche Charakterisierung lassen es geraten erscheinen, auf seine besondere physiologische Bedeutung anhand seiner Erscheinung in der Immunelektrophorese nicht weiter einzugehen. Trotzdem habe ich es auf Grund seines möglichen ITI-Derivat-Charakters in die Berechnungen als solches miteinbezogen. Im weiteren Verlauf wird aber in erster Linie von dem eindeutigeren Derivat D. 1 die Rede sein.

ITI und seine säurelabilen Derivate
Mittelwerte sämtlicher Elektrophoresen

Krankheiten	Kurvenflächen d. 2d-ImE in mm ²			1d-ImE n.L.	Relativverteilung in d, 2d-ImE in %			
	Prec.	D. 1	D. 2		Prec.	D. 1	D. 2	n
Normalwerte	449	243	38	1,00 (=57 mm)	62	33	5	n= 14
1) Nephropathien m. komp. Retention	296	475	19	0,92	40	57	3	n= 21
2) Nephropathien m. chron. Ni. Insuff.	329	799	31	1,14	30	67	4	n= 58
3) Sepsis u. Schock	160	647	14	0,65	23	75	2	n= 99
4) Lebercirrhose	252	435	68	0,76	31	60	9	n= 33
5) Leberinsuff. u. Leberkoma	186	557	22	0,57	22	76	2	n= 24
6) Chron. Pankreatitis	364	271	44	1,00	53	40	6	n= 24
7) Hepatitis	441	355	42	1,11	52	42	6	n= 12
8) Cholangitis Endokarditis Pneumonie	313	368	44	/	43	48	7	n= 4
9) Präsechock	344	470	36	1,07	40	56	4	n= 4
10) Pseudobartter Ess. Hypertonie	369	239	54	1,10	56	35	9	n= 6
11) Neoplasien m. normal. Verteil.	330	185	17	0,82	63	35	3	n= 9
12) Neoplasien m. erhöhtem Deriv.	252	482	18	0,76	36	61	3	n=21
13) 15 % Verbrenn.	199	257	/	0,65	44	56	/	n= 4

Abb. 5: Tabellarische Übersicht der errechneten Mittelwerte
sämtlicher verwertbarer Elektrophoresen (n = 333)

Anmerkung:

Durch die jüngsten Untersuchungen des ITI und der SLD in der 2d-ImE, in den Labors von Prof. Hochstraßer - diesmal mit noch exakteren und einheitlicheren Methoden, sowie Antiserum der gleichen Batch-Nr. - wurden die hier erhobenen Befunde in ihrer Größenordnung und Tendenz voll bestätigt.

Die folgenden Ergebnisse fußen auf der Erstellung von 333 zweidimensionalen Immunelektrophoresen mit Inter- α -Trypsininhibitor-Antiserum vom Kaninchen der Fa. Behring/Marburg: Batch-Nr. 1916 BL, 1916 BM. Parallel dazu wurde von fast allen untersuchten Seren eine eindimensionale Immunelektrophorese nach Laurell zur selektiven Darstellung des Inter- α -Trypsininhibitors angefertigt. Die pathologischen Seren stammten aus Blutabnahmen bei insgesamt 84 Patienten der Chir. und Med. Klinik/Innenstadt der LMU.

2. Pathologische Befunde

Die Patienten mit Nierenleiden wurden nach ihrem anhand der Serum-Kreatininwerte festgestellten Filtrationsvermögen in je eine Gruppe mit "Kompensierter Retention" (≤ 10 mg/100 ml) und eine mit "Niereninsuffizienz" (>10 mg/100 ml) eingeteilt.

2.1. Nephropathien im Stadium der kompensierten Retention (Abb.6)

Als erstes Kollektiv wurden Patienten mit Nephropathien im Stadium der kompensierten Retention untersucht. In ihren Seren zeigt sich gegenüber denen von gesunden Personen bei beiden Auswertungsverfahren ein geringer Abfall des ITI, der mit einem ebenso klaren

Anstieg des D.1 parallel geht; bei D.2 dagegen findet man einen leichten Abfall der Flächen- und Prozent-Anteile. Mit dem Abfall des ITI in der 2d-ImE, würde auch die leichte Höhenabnahme bei der Auswertung sämtlicher Elektrophoresen in der 1d-ImE,n,L. korrelieren.

2.2. Nephropathien mit chron. Niereninsuffizienz und Hämodialyse (Abb. 7)

Um ein Erhebliches sind die Werte bei Patienten mit chron. Niereninsuffizienz verschoben. Hier zeigt sich in der 2d-ImE, beim ITI eine leichte Erniedrigung der Flächenwerte, der jedoch in der 1d-ImE,n,L. eher die Tendenz einer leichten Erhöhung gegenübersteht.

Geradezu explosionsartig erscheint dagegen der Anstieg des säurelabilen D.1 zu sein, was natürlich bei einem Relativprozent-Anteil von 67 % zwangsläufig zu einem niedrigen ITI-Wert führen muß.

Berücksichtigt man somit die Ergebnisse der 1d-ImE,n,L., so wäre trotz des niedrigen Prozent-Anteils noch an einen normalen, wenn nicht sogar trotz möglicherweise gesteigerten Umsatzes noch vermehrten ITI Spiegel zu denken.

Bestimmungen der Inhibitor-Aktivität des ITI und des säurestabilen Proteinase-Inhibitors I-30, die in diesen Fällen beide signifikant erhöht waren (Hochstraßer, Zeitlmann, unveröff.), sprechen aber eher dafür, daß es in den Nieren zu einer Abbauverminderung kommt. Der Anstieg des D.1 wäre aber auf einen dennoch gesteigerten Umsatz zurückzuführen, der intravasal und ubiquitär abläuft.

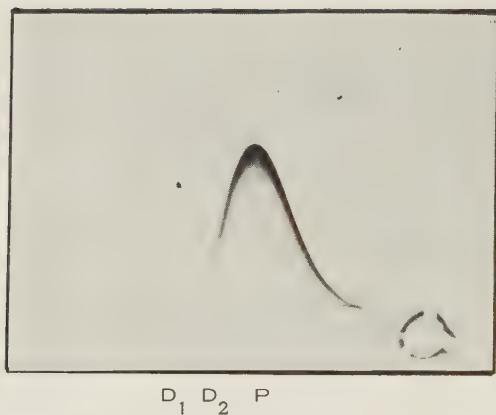


Abb. 6a: 2d-ImE.

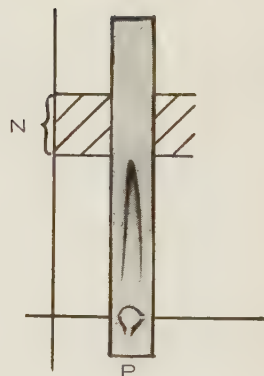


Abb. 6b: 1d-ImE.

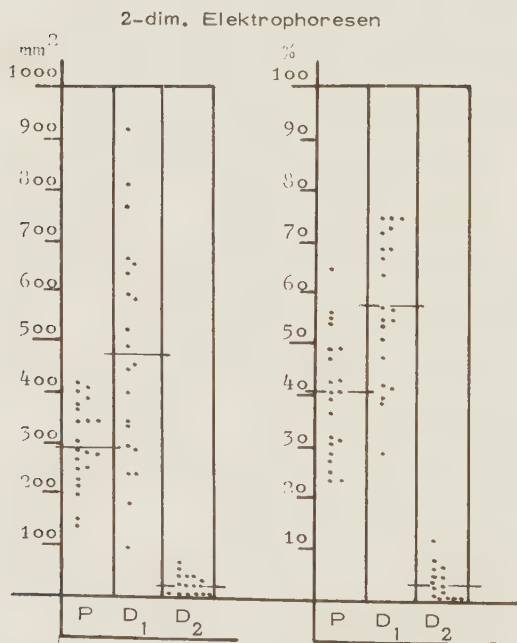


Abb. 6c: $n = 21$

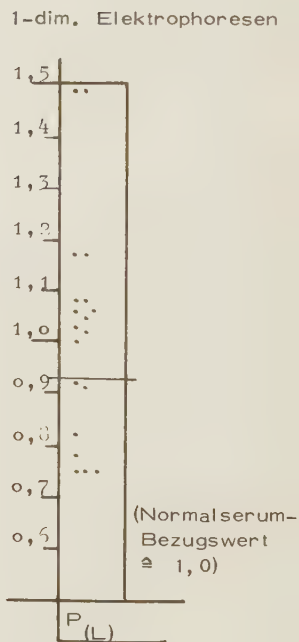


Abb. 6a-c: Nephropathien mit kompensierter Retention

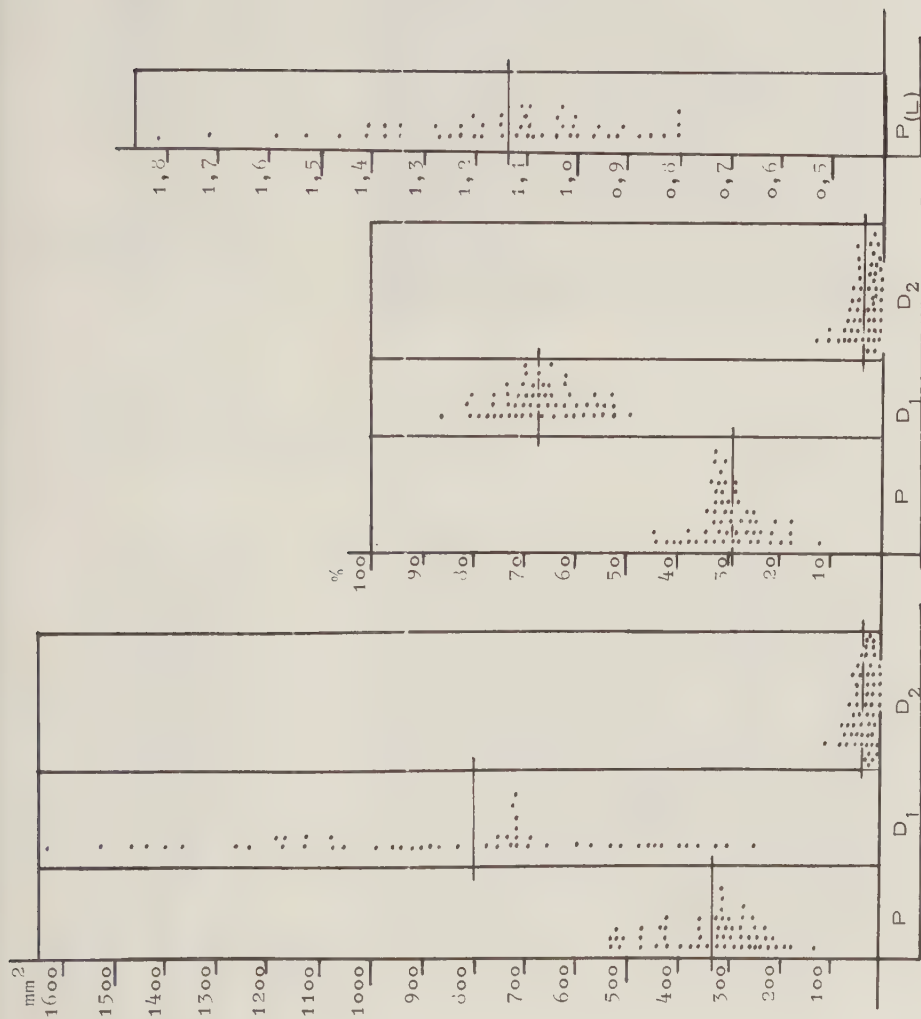


Abb. 7a: $n = 58$



Abb. 7b: 2d-ImE.

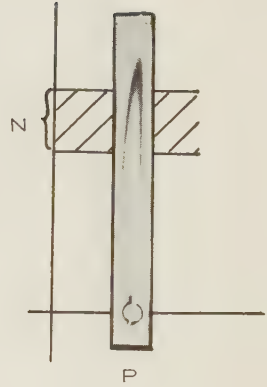


Abb. 7c: 1d-ImE.

Abb. 7a-c: Nephropathien mit chron. Niereninsuffizienz u. Hämodialyse

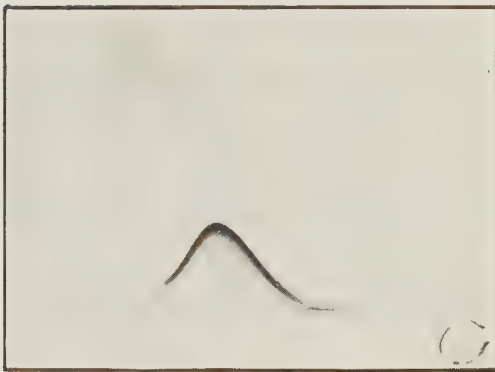


Abb. 8a: 2d-ImE.

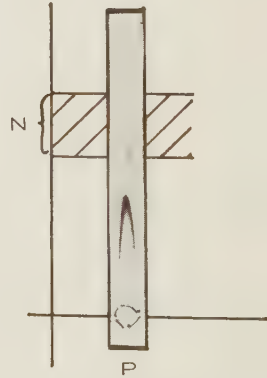


Abb. 8b: 1d-ImE.

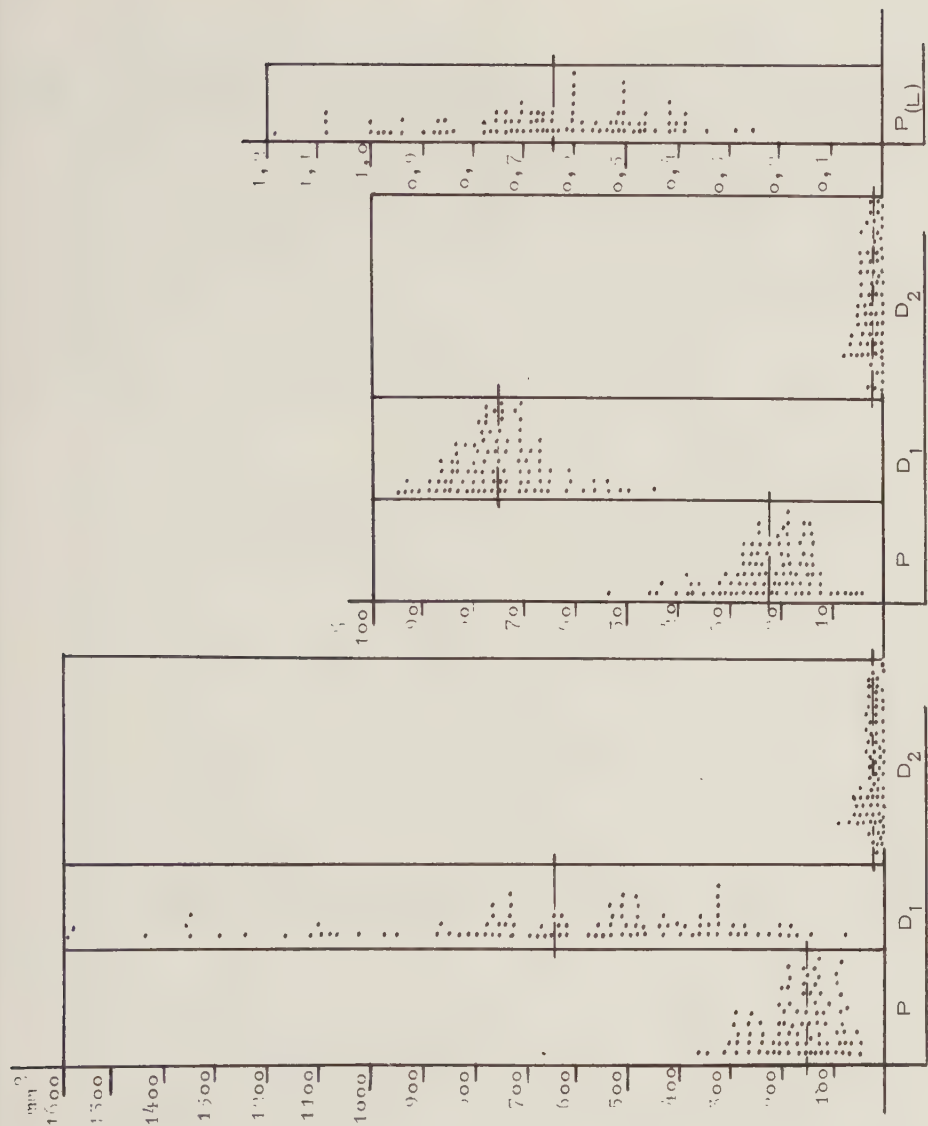


Abb. 8c: n = 99

Abb. 8a-c: Patienten mit Sepsis und Schock

Die ungeheuerere Streuung in den Flächengrößen des D.1 ließe sich

- 1) durch die nicht absolut identischen Antiseren erklären und
- 2) dadurch, daß in den oberen Bereichen der Elektrophoreseplatten bezüglich einer quantitativen Auswertung möglicherweise keine direkte Proportionalität mit den unteren Bezirken mehr gegeben ist.

2.3. Patienten mit Sepsis und Schock (Abb. 8)

Am eindruckvollsten sind die Ergebnisse bei den Untersuchungen von schwerkranken Patienten im Schock nach Polytraumata, Operationen und akuter Pankreatitis, wie auch mit septischem Schock und Urämie.

Es zeigt sich hierbei eine eindeutige Verminderung des intakten ITI auf fast ein Drittel des Normalwertes. Berücksichtigt man nun noch die Id-ImE.n.L. mit einer durchschnittlichen Erniedrigung auf ca. 65 %, so läßt dies mit ziemlicher Sicherheit auf eine Abnahme der ITI-Menge auf gut die Hälfte schließen. Diesem eindeutigen Mangel an intaktem ITI entspricht nun wiederum ein exzessiver Anstieg des säurelabilen D.1, dessen Flächen-Mittelwert zwar etwas hinter dem bei Niereninsuffizienz zurückbleibt (Streuungsgründe siehe dort), dessen Prozent-Anteil aber aufgrund der niedrigen ITI-Menge ganze 75 % erreicht.

Diese genannten Werte lassen annehmen, daß es sich bei den Fällen mit Sepsis und Schock um einen erheblich gesteigerten Abbau des Precursors (ITI) handelt. Die Größe seines Verlustes kann offensichtlich nicht so schnell durch eine Mehrproduktion an Precursor kompensiert werden.

Aus dem Rahmen dieses Denkschemas fällt bei jenen Fällen (wie auch im Folgenden s.u. unter 2.5.) das Verhalten des als D.2 eingeführten Peaks. Als zweites Abbauprodukt des ITI würde man analog zu D.1 einen D.2-Anstieg erwarten. Statt dessen überrascht D.2 in beiden Auswertungsverfahren mit seiner größten beobachteten Verminderung, wobei es in einer nicht unerheblichen Anzahl von Fällen überhaupt nicht identifiziert werden konnte. Zwar ist diese Tatsache auch bei anderen Krankheitsbildern z.T. beobachtet worden, jedoch niemals in so augenfälliger Häufigkeit. Das Verhalten des D.2 bei Sepsis und Schock scheint somit der Annahme zu widersprechen, es könne sich hierbei um ein normales und gleichbedeutendes Abbauprodukt des ITI handeln.

Aus den Verlaufskontrollen in Abb. 12 wird ersichtlich, wie sich im Laufe der Besserung des Allgemeinzustandes nach schwerem Schock auch die Werte des ITI und der SLD wieder normalisieren.

2.4. Patienten mit Präshock und Infarkt

Für die Theorie eines verstärkten ITI-Abbaus sprechen auch die bei Patienten mit Präshock erhobenen Befunde. Bereits bei noch nicht voll ausgebildetem Schock sind alle drei Werte nicht unerheblich in Richtung Schocksymptomatik verändert. (Abb. 5)

2.5. Patienten mit Leberinsuffizienz und Leberkoma (Abb. 10)

Starke Ähnlichkeiten mit den Befunden bei Sepsis und Schock fanden sich bei den Patienten mit Leberinsuffizienz und Leberkoma. Die bei den beiden Patientengruppen infolge nicht hundertprozentig einheitlicher Antiseren (s.o.) auftretenden Flächenunterschiede werden hier

durch die Angabe der Relativprozente besonders deutlich ausgedrückt. Die unter 2.3. geschilderte Erhöhung des D.1. ist hier ebenfalls anzutreffen. Die ITI-Bestimmung in der 1d-ImE, n.L., erreichte hier die niedrigsten Werte.

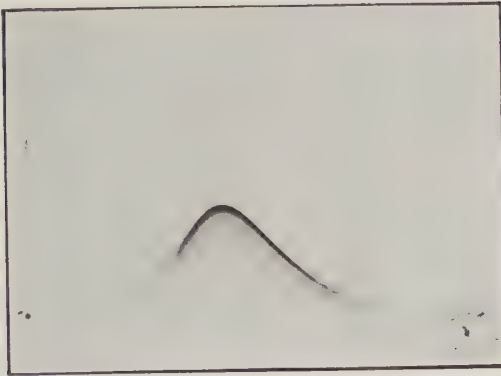
Besonders beeindruckend ist der Verlauf von ITI und D.1 bei Patienten mit letalem Leberkoma in den letzten prä-mortalen Tagen. (Abb. 11) Der ITI bewegt sich bei extrem niedrigen Werten stets nach unten; parallel dazu der Anstieg von D.1. Ein D.2 war in der überwiegenden Zahl dieser Elektrophoresen nicht zu identifizieren. Die vereinzelt festgestellten ließen ebenfalls auf eine Verminderung schließen.

2.6. Patienten mit Lebercirrhose (Abb. 9)

Bereits bei den Patienten mit Lebercirrhose korreliert eine zwar nicht so augenfällige, so dennoch signifikante Verringerung des ITI in der 2d-ImE mit den Werten der 1d-ImE, n.L.. Eine Erniedrigung des AS-Angebotes an die potentiellen Bildungsorte des ITI wäre zumindest denkbar. Da die Lebercirrhose ja auch nicht selten in eine zum Koma führende Leberinsuffizienz übergehen kann, sind für 2.5. und 2.6. wahrscheinlich dieselben pathophysiologischen Prozesse verantwortlich zu machen.

2.7. Patienten mit chron. Pankreatitis (Abb. 13)

Die bei dieser Patientengruppe gefundenen Ergebnissen ähneln denen von gesunden Personen. Zwar bewegt sich der ITI im unteren Streubereich, das D.1 hingegen in seinem oberen. Eine signifikante Veränderung kann aber daraus, möglicherweise auch infolge der zu geringen Fallzahl, nicht abgeleitet werden.



D₁ D₂ P

Abb. 9a: 2d-ImE.

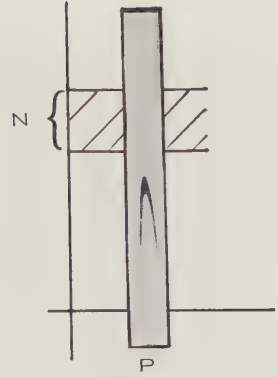


Abb. 9 b: 1d-ImE.

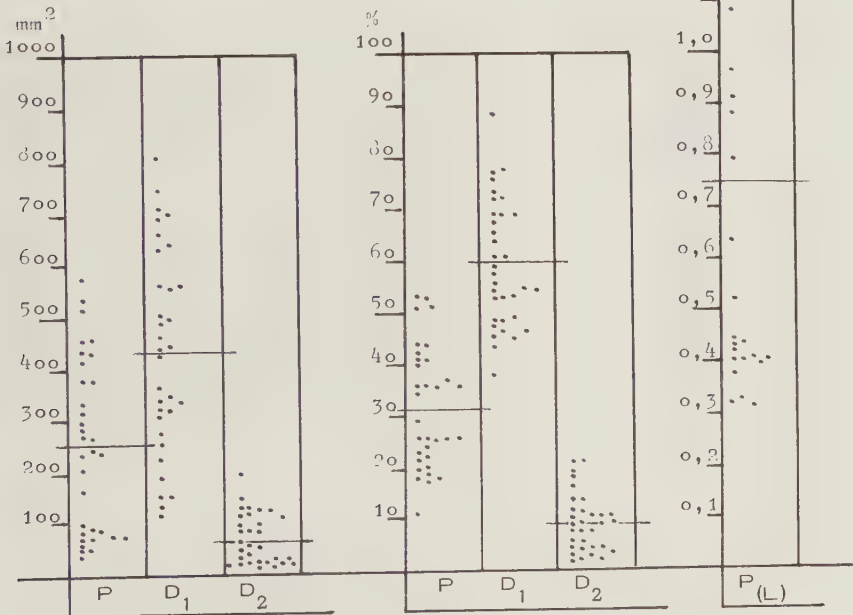


Abb. 9c: n = 33

Abb. 9a-c: Patienten mit Lebercirrhose

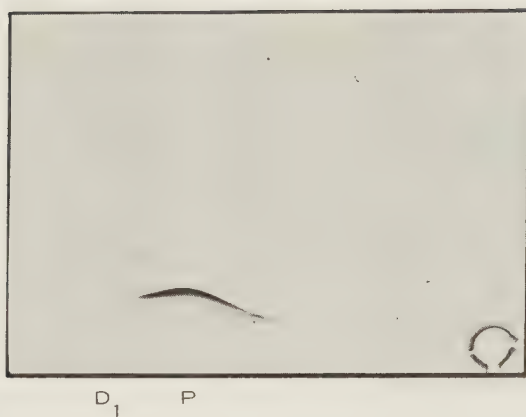


Abb. 10a: 2d-ImE.

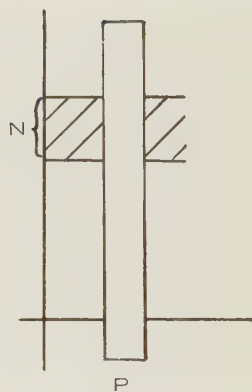


Abb. 10b: 1d-ImE.

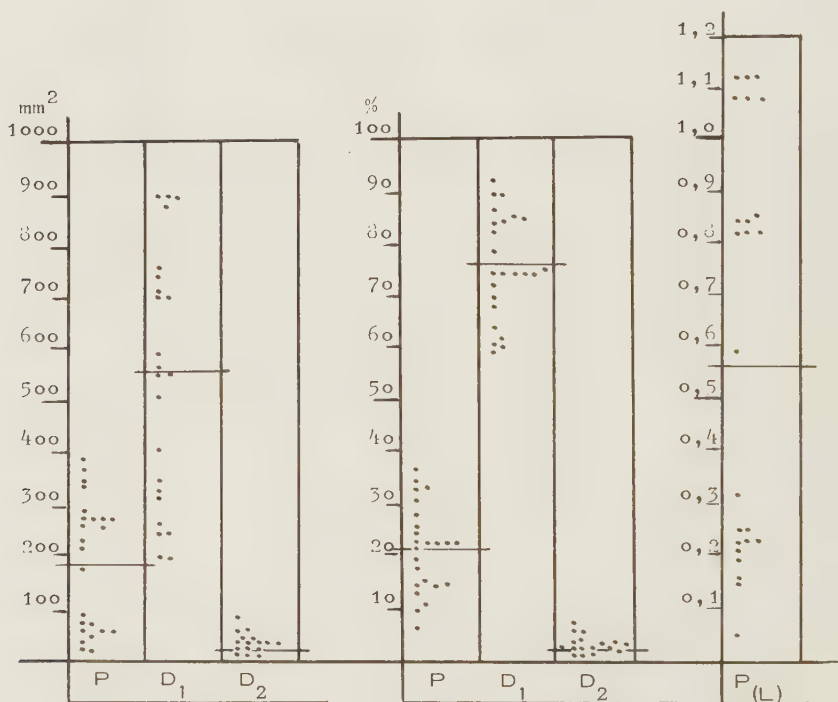
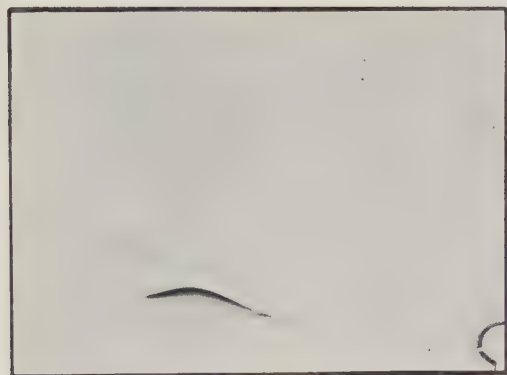
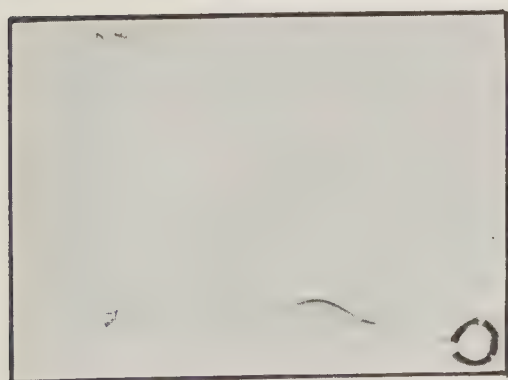
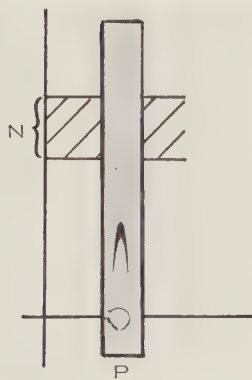


Abb. 10a-c: Patienten mit Leberinsuffizienz und Leberkoma



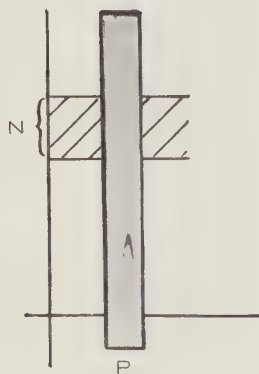
D_1 P

Abb. 11a



D_1 P

Abb. 11b



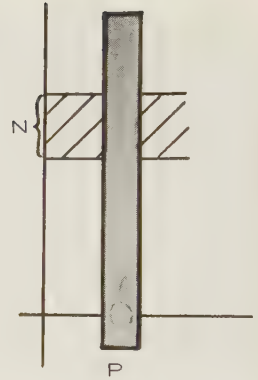
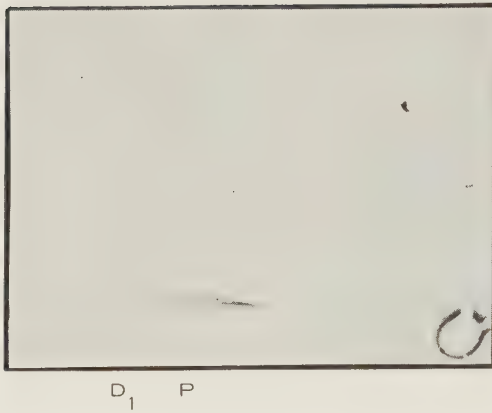


Abb. 11c

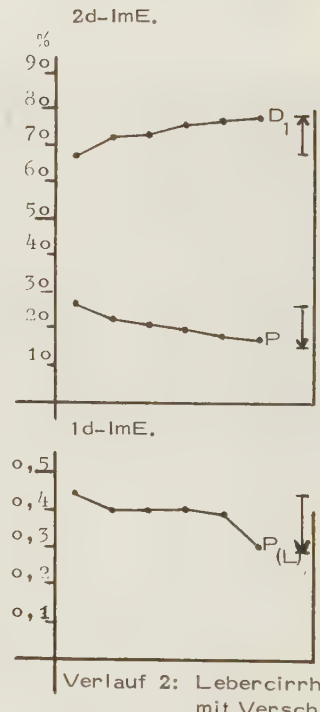
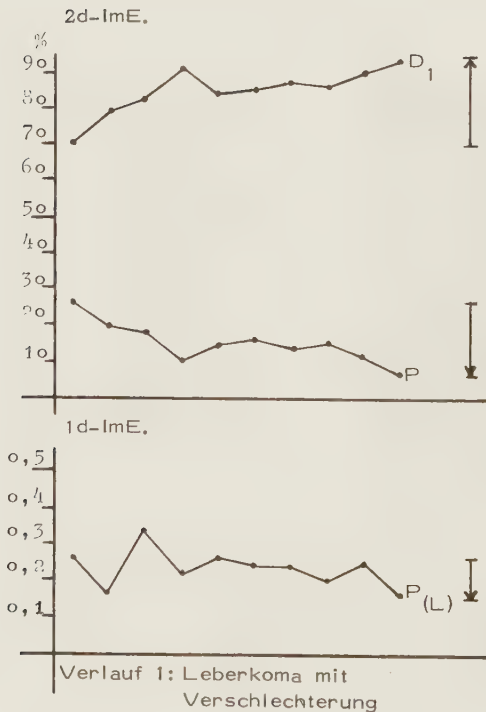


Abb. 11d

Abb. 11a-d: Patienten mit einer Verschlechterung ihres Zustandes

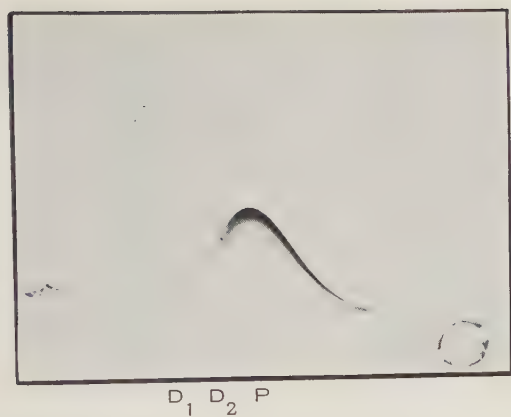


Abb. 12a

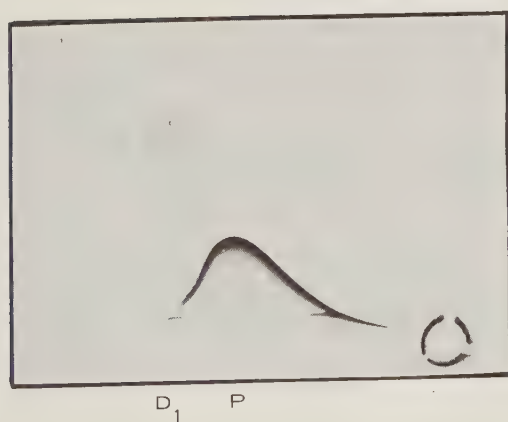
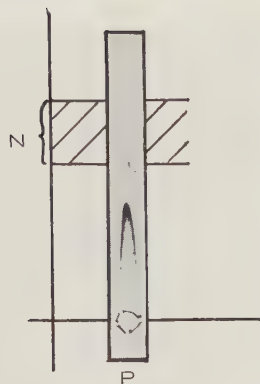
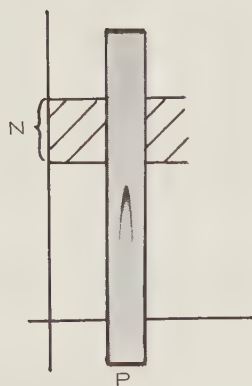
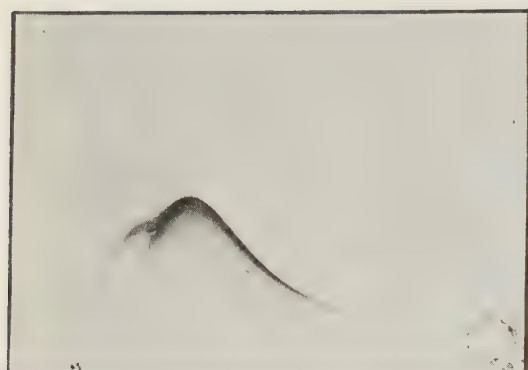


Abb. 12b





D₁ D₂ P

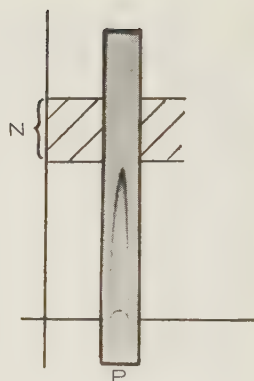


Abb. 12c

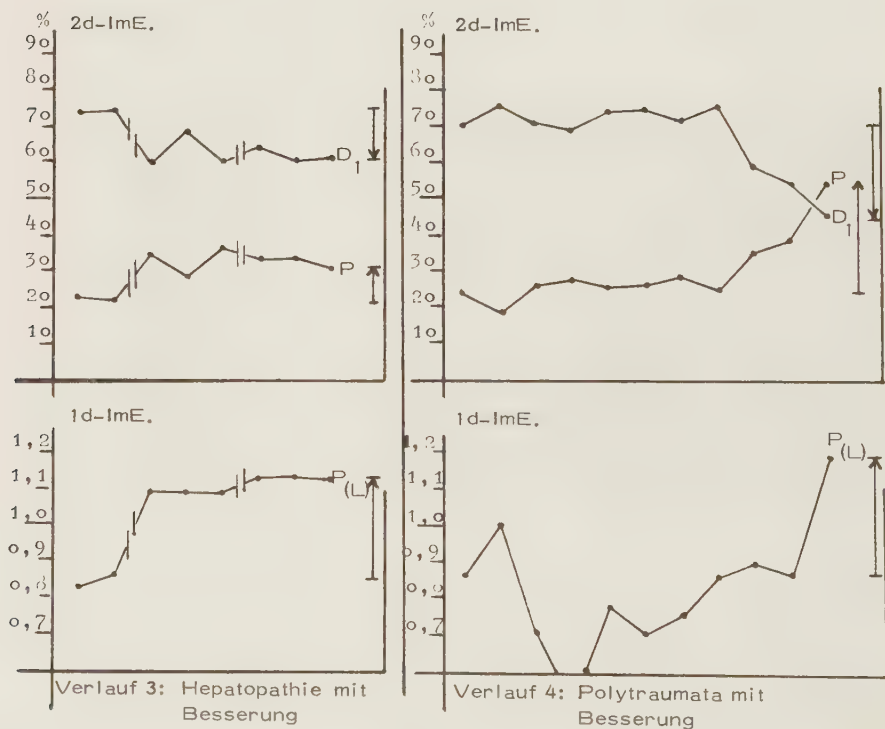


Abb. 12d

Abb. 12a-d: Patienten mit einer Besserung ihres Zustandes

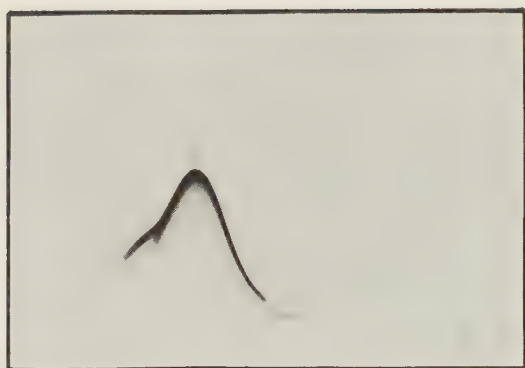
2.8. Patienten mit Hepatitis (Abb. 14)

Die hierbei erhobenen Befunde ähneln den unter 2.7. beschriebenen. Dies trifft in besonderem Maße für die Relativprozent-Aufstellung zu. Der etwas größeren ITI-Fläche entspricht ein hoher Laurell-Wert. Allerdings weisen diese Zahlen nicht gerade in Richtung auf die übrigen, oben bereits aufgeführten Werte bei schwereren Hepatopathien. Von einer Erniedrigung des ITI kann aufgrund der nur minimalen Relativprozent-Senkung nicht gesprochen werden.

2.9. Patienten mit verschiedenen Entzündungen (Abb. 15)

Die hierbei subsummierten Einzelfälle (Pneumonie, Endocarditis, Cholangitis) lassen im Gegensatz zu den beiden letztgenannten Gruppen zumindest auf eine leichte pathologische Umsatzsteigerung des ITI schließen. Wenn uns auch in diesen Fällen aus der 1d-ImE. keine brauchbaren Präzipitationspeaks zur Verfügung stehen, so entsprechen die Ergebnisse der 2d-ImE. aber ungefähr denen, die unlängst in unserem Labor von Bronchitiker-Seren erhalten wurden. (Hochstraßer, unveröff.)

Um aber definitiv von einer signifikanten Umsatzerhöhung bei entzündlichen Erkrankungen jeglicher Genese sprechen zu können, ist das hier vorgelegte Kollektiv bei weitem zu gering, zumal auch die Werte bei chron. Pankreatitis und bei Hepatitis eine solche Theorie offensichtlich nicht unterstützen.



D₁ D₂ P

Abb. 13a: 2d-ImE.

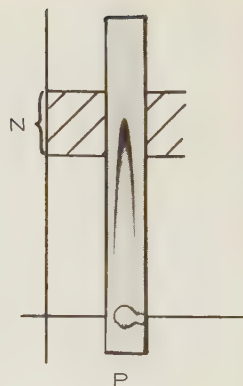


Abb. 13b: 1d-ImE.

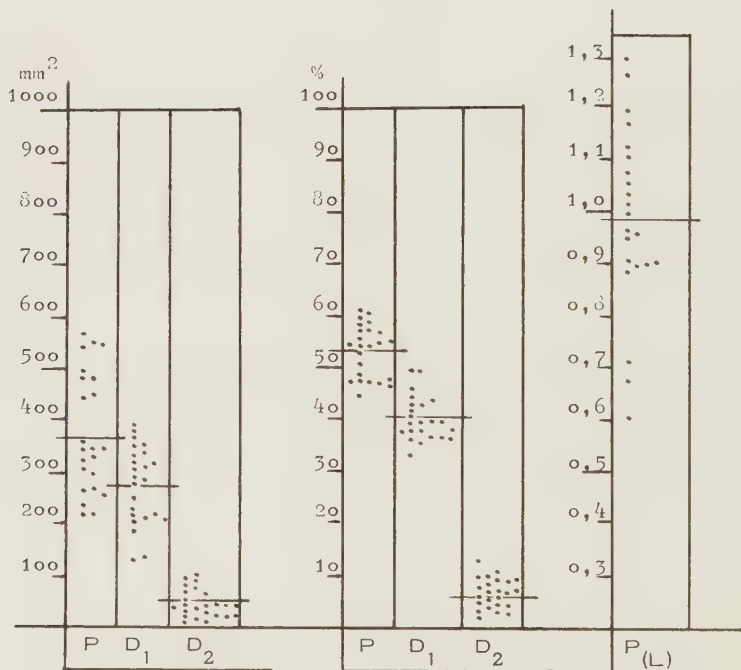


Abb. 13c: n = 24

Abb. 13a-c: Patienten mit chron. Pankreatitis

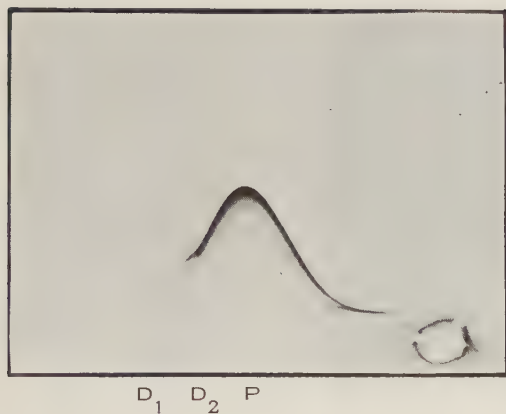


Abb. 14a: 2d-ImE.

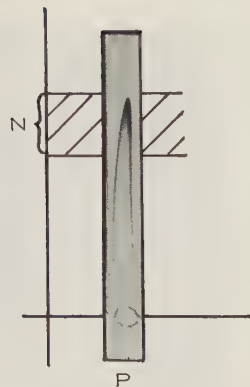


Abb. 14b: 1d-ImE.

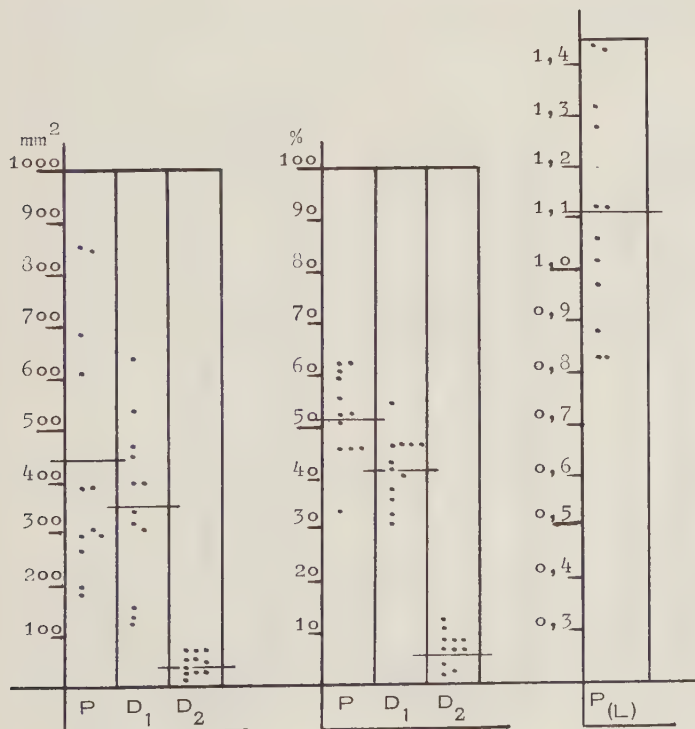
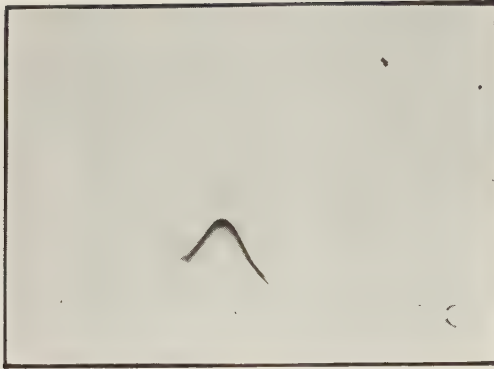


Abb. 14c: n = 12

Abb. 14a-c: Patienten mit (chron. aggress.) Hepatitis



D₁ D₂ P

Abb. 15a: 2d-ImE.

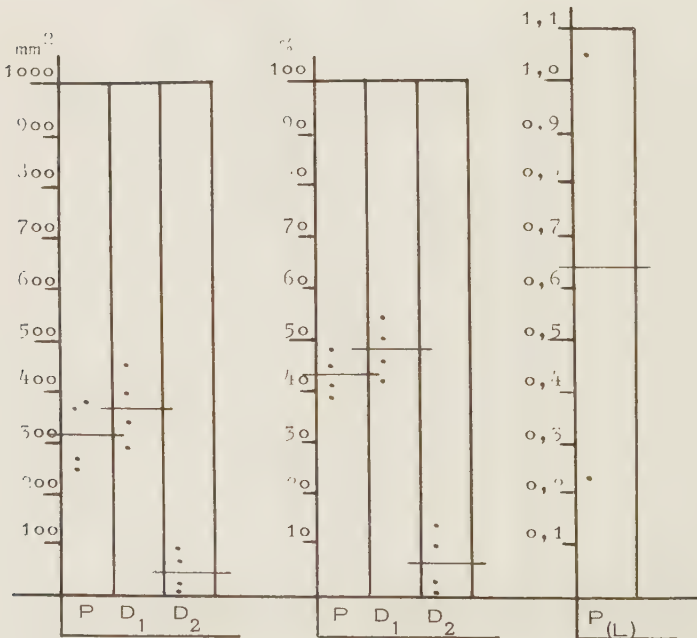


Abb. 15b: n = 4

Abb. 15a, b: Patienten mit verschiedenen Entzündungen

2.10. Krankheiten mit normalem Verteilungsmuster

Ein relativ unauffälliges Elektropherogramm fand sich bei zwei weiteren untersuchten Patientengruppen, Kranke mit Pseudobartter zeigten ebenso wie Personen mit einer essentiellen Hypertonie keine Anzeichen für einen vermehrten ITI-Umsatz. (Abb. 5)

2.11. Patienten mit Neoplasien und unauffälligem ITI-Verteilungsbild (Abb. 16)

In dem von mir untersuchten Kollektiv von 15 Tumorpatienten fanden sich vier Probanden mit unauffälligem Elektrophorese-Muster. Es handelte sich hierbei um:

Malignes Melanom (n=1) – Pankreaskopf-Carzinom (n=1) –
Struma maligna (n=2).

In Anbetracht der normalen Prozent-Verteilung kann lediglich aufgrund einer leichten Verminderung des Mittelwertes bei der ITI-Fläche und parallel dazu bei der 1d-ImE.n.L. auf eine verringerte Produktion als evtl. Folge des allgemein kachektischen Zustandes geschlossen werden.

2.12. Patienten mit Neoplasien und verändertem ITI-Verteilungsbild (Abb. 17)

Die zweite Gruppe von Tumorpatienten hingegen zeigt wiederum die uns bereits bekannte Verschiebung in der Präzipitat-Verteilung, die auf einen gesteigerten ITI-Abbau hinweist. Auch die Werte des ITI in der 1d-ImE.n.L. sind herabgesetzt.

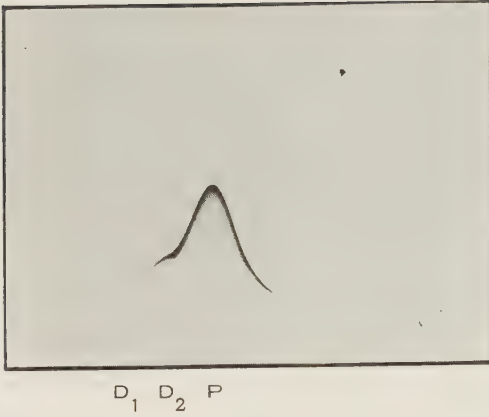


Abb. 16a: 2d-ImE.

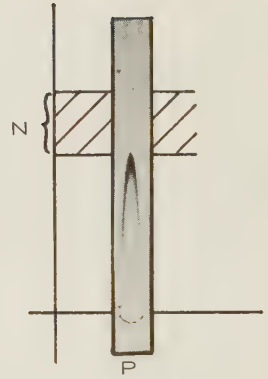


Abb. 16b: 1d-ImE.

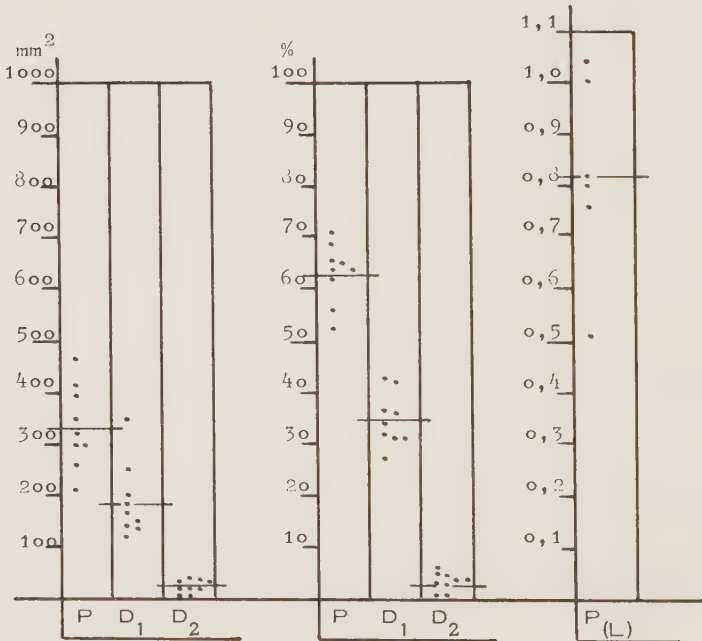


Abb. 16c: n = 9

Abb. 16a-c: Neoplasien mit unauffälligem Verteilungsbild

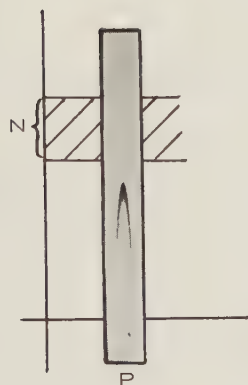
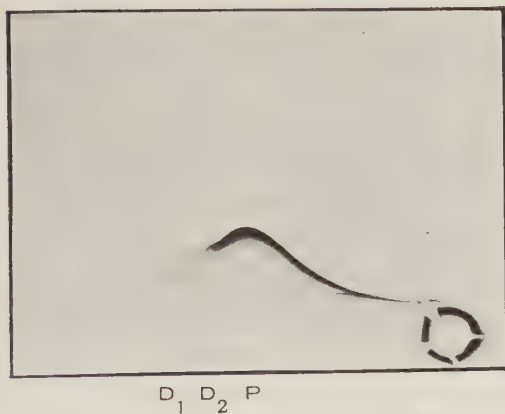


Abb. 17a: 2d-ImE.

Abb. 17b: 1d-ImE.

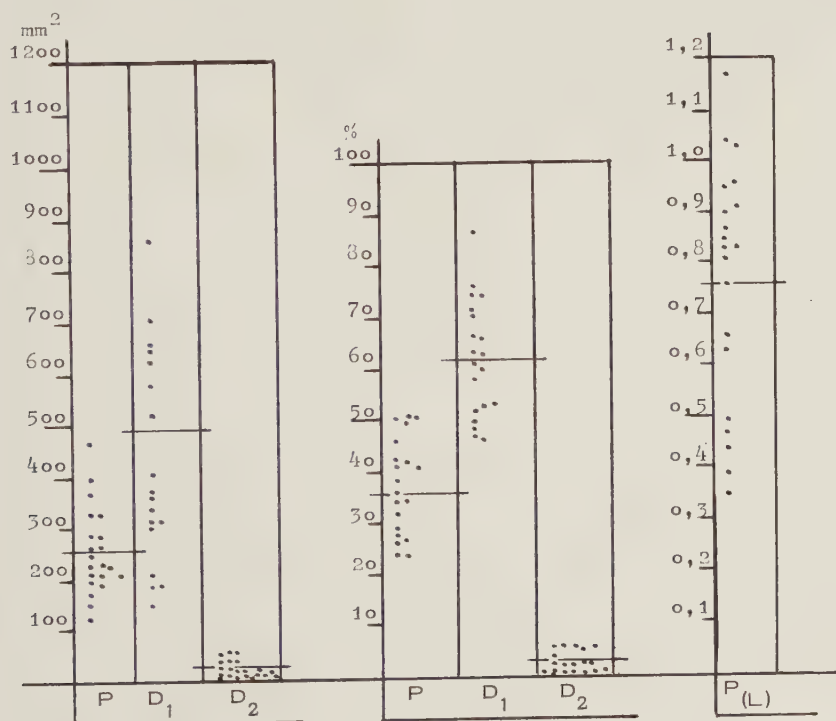


Abb. 17c: n = 21

Abb. 17a-c: Neoplasien mit verändertem Erscheinungsbild

Die hierbei angetroffenen Diagnosen waren:

Mamma-Ca (n=3) - Intestinale Ca (n=3) - Collum-Ca (n=1)
Hepatozelluläres Ca (n=1) - Lebersarkom (n=1) -
Retikulum-Zell-Sarkom (n=1) - Fibrosarkom (n=1).

2.13. 15 ‰ Verbrennungen

Bei dem einzig untersuchten Serum eines Patienten mit erheblichen Verbrennungen konnte anhand von vier Elektrophoresen (2d-ImE.) und von 1d-ImE., n.L., der von Hochstraßer u. Rasche durch Bestimmung des säurestabilen I-30 bereits vermutete gesteigerte ITI-Umsatz durch die Peak-Verteilung bestätigt werden.

VI. DISKUSSION

Als Erstes kann aufgrund dieser erhobenen Befunde festgestellt werden, daß verschiedene pathologische Zustände mit einer Vergrößerung des als Derivat D,1 bezeichneten Präzipitates einhergehen.

Desweiteren kommt es oftmals parallel zu dieser Zunahme zu einem Abfall des ITI-Peaks in beiden Verfahren.

Dieses Ergebnis scheint in der Tat die Vermutung zu bestätigen, daß bei einer Vielzahl schwerer Erkrankungen die normalerweise durch begrenzte proteolytische Serumaktivität bedingte Umsetzung des ITI in erhöhtem Maße abläuft.

Von ihrer Pathophysiologie her lassen ein paar Krankheitsformen, bei denen eine eindeutige SLD-Vermehrung gefunden wurde, Kallikrein durchaus als mögliches physiologisches "liberating enzyme" in Betracht kommen. Am ehesten wäre dies aus den Befunden der Gruppe "Sepsis und Schock" ersichtlich. Die Schocksymptomatik mit Blutdruckabfall, peripherer Vasodilatation etc. wird ja sicher durch eine vermehrte Kininwirkung hervorgerufen. Ein anderer möglicher Grund für die ITI-Erniedrigung wäre auch in der gleichzeitigen Sepsis zu suchen. Der gegen Proteolyse sehr empfindliche Precursor könnte unter Umständen auch von freiwerdenden Bakterien-, Pilz- oder Leukozytenproteasen angegriffen werden.

Die Präzipitat-Verteilungen bei den Patienten mit Lebercirrhose, Leberinsuffizienz und Leberkoma rücken ebenfalls das Kallikrein in den Bereich einer möglichen diesbezüglichen Enzymaktivität. Kommt es doch nicht selten während einer chron. Leberinsuffizienz im Rahmen der "Hyperdynamischen Zirkulation" zu einem der Schocksymptomatik ähnlichen Kreislaufverhalten. (21) Geht man davon aus, daß Plasmin eine Kallikrein-Aktivierung bewirken kann (60, 61, 12, 9), so muß man berücksichtigen, daß Sharp und Back unter anderem bei Schock-

zuständen und verschiedenen Leberschäden, z.B. der Lebercirrhose, einen erhöhten freien Plasminspiegel fanden. (49, 4)

Daß eine gesteigerte Aktivierung von Präkallikrein denkbar wäre, beweist der von Wong (65) und Paskhina (43) beschriebene Abfall dieses Proteins bei Lebercirrhose. Die verschwindend geringe Menge an intaktem ITI bei dem in Abb. 11 gezeigten Patienten mit Leberausfallskoma ist dagegen sicherlich als Folge der Leberfunktionseinstellung anzusehen. Voreilig wäre es, wegen dieser starken ITI-Senkung sofort die Leber als Syntheseort des ITI annehmen zu wollen. Unbestreitbar aber wird ein vermindertes AS-Angebot infolge der Leberinsuffizienz zu einer verringerten ITI-Produktion führen müssen.

Eine klare Deutung der Werte bei Nephropathien läßt sich noch nicht machen. Legt man die Ergebnisse der neuesten ITI-, I-30- und SLD-Bestimmungen zu Grunde (Hochstraßer, Niebel; Zeitlmann), so ergibt sich:

Die Niere ist Hauptumsatzorgan für das System Proinhibitor-Inhibitor. Bei Nierenerkrankungen ist der Umsatz eingeschränkt, es resultiert ein Anstieg der Precursorkonzentration. Die Übereinstimmung mit den Werten in der 2d-ImE ist zumindest in soweit gegeben, als die absoluten ITI-Flächen relativ normal sind; die Bestimmung des ITI in der 1d-ImE, n.L. weist ebenfalls in Richtung ITI-Zunahme. Der erhebliche Anstieg des D.1 ist allerdings mit einer eingeschränkten Filtration oder einer Einschränkung des ITI-Abbaus nicht zu erklären, da es wegen seines hohen MG auch bei Gesunden nicht filtriert werden kann und eine Abnahme des ITI-Umsatzes das Gegenteil bewirken müßte. Es bleibt als einzige Möglichkeit somit nur ein gesteigerter, anderswo lokalisierter Abbau. Ein solcher wäre durchaus auch intravasal denkbar.

Die gefundenen Werte bei drei Patienten mit verschiedenen Entzündungen könnten durch eine gesteigerte Wirkung sowohl des Kallikreins (17) wie auch irgendeines anderen proteolytischen Enzyms verursacht sein. Überraschend sind in diesem Zusammenhang allerdings die Fälle mit Hepatitis und chronischer Pankreatitis, die in der 2d-ImE. kaum Anzeichen einer geänderten Verteilung aufweisen. Dieses erscheint vor allem für letzteres Krankheitsbild unklar, da zumindest bei akuter Pankreatitis eine Freisetzung des Pankreaskallikreins mit folgendem Schock allgemein bekannt ist (17), und auch bei Exacerbation der chron. rezidivierenden Pankreatitis eine Zunahme der vasoaktiven Substanzen von Thal nachgewiesen wurde. (57) Eine Deutung dieser Befunde in Übereinstimmung mit der Kallikrein-Theorie ist offensichtlich nicht möglich.

Ebenso offen ist die Frage nach der Ursache zweier verschiedener Erscheinungsbilder bei Neoplasie-Patienten. Eine Verbindung zu fortgeschrittener Metastasierung ließ sich zumindest nicht feststellen.

Verständlicher dagegen wäre noch das Ergebnis bei Verbrennungen, da thermische Schädigungen laut Rocha e Silva zu einer erhöhten Kininfreisetzung führen können. (47)

Unklar allerdings sind unsere bisherigen Vorstellungen betreffs des Derivates D.2. Seine starke ITI-Überlagerung, seine schlechte Darstellbarkeit und sein mit dem D.1 offensichtlich nicht korrelierendes Verhalten lassen nicht einmal seinen Derivat-Charakter eindeutig beweisen.

Welche physiologische und insbesondere pathophysiologische Bedeutung dem Vorgang der proteolytischen Inhibitor-Freisetzung aus dem ITI und damit möglicherweise auch den hierbei freiwerdenden SLD zugeordnet werden kann, müssen weitere Forschungen ergeben.

VII. MATERIAL UND METHODEN

1. Aufstellung des verwendeten Materials

Vorgereinigte Diaglaser im Format 5 x 5 cm

" " Glasplatten " " 10 x 10 cm

Hamilton-Pipette 10 μ l

2 % wässrige Agarose-Lösung

0,15 M Barbituratpuffer mit pH 8,6

Anti-Human-Inter- α -Trypsininhibitor Serum v. Kaninchen,
Batch-Nr. 1916 BL u. 1916 BM d. Behringwerke/Marburg

Färbelösung mit: Coomassie Brilliant Blue G 250

Entfärber: Methanol/Eisessig-Gemisch (9:1)

2. Praktisches Vorgehen

2.1. Anfertigung der zweidimensionalen Immunelektrophoresen

Die hierbei angewendete Methode nach Stephan u. Frahm (56) ist eine Weiterentwicklung der von Clarke u. Freeman (10) modifizierten Immunelektrophorese nach Laurell (40). Diese Methode kann als Kombination der einfachen Agarosegel-Elektrophorese und der Elektroimmunodiffusion angesehen werden.

Die erste Dimension besteht in der Auftrennung des Proteingemisches im Serum aufgrund der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten im elektrischen Feld. In der zweiten Dimension erfolgt sodann die quantitativ auswertbare Immunpräzipitation, und zwar in einem Agarosegel, das monospezifisches Antiserum enthält. (5)

Die bereits vorgereinigten Diaglaser mit den Maßen 5 x 5 cm werden mit 96 % Alkohol abgeflammt um sie zu entfetten.

2 ml der bis zur Verflüssigung erhitzten 0,2 % Agaroselösung werden mit 2 ml 0,15 M Barbituratpuffer vermischt und auf die absolut horizontal gelagerte Glasplatte gegossen. Ist die Agaroseschicht erkaltet, so wird in die beiden unteren Ecken in etwa 0,6 mm Entfernung von den Rändern mit der Wasserstrahlpumpe je ein Loch von ca. 2 mm Durchmesser gestanzt. Mit der Hamilton-Pipette wird in das linke der beiden Löcher 8 μ l des zu untersuchenden Serum eingebracht, in das rechte 8 μ l eines Normalserums. Letzteres wird mit Bromphenolblau markiert und dient zur Verfolgung der Laufgeschwindigkeit. Danach startet man die Elektrophorese in Richtung Anode mit einer Spannung von 300 V. In einer Kammer fanden acht Platten gleichzeitig Platz. Nach ca. 1,5 – 2 Std. hat das mit Bromphenolblau markierte Albumin die Strecke bis zum anodenseitigen Elektrophoresepapier zurückgelegt und die Phase der Auftrennung ist abgeschlossen. Bis zur weiteren Verwendung werden die Platten in feuchtem Milieu aufbewahrt. Mit einer ca. 15 cm langen Schneidklinge durchtrennt man das Agarosegel wenige mm rechts neben dem zu untersuchenden Serum, parallel zur Laufrichtung und entfernt die rechts liegende Agaroseschicht mit dem Kontrollserum. (Abb. 18) Auf die nun freigewordene Fläche gießt man wiederum erhitzte 2 % Agarose, diesmal aber vermischt mit 0,15 M Barbituratpuffer – jeweils 1,5 ml – sowie 100 μ l Anti-Inter- α -Trypsin-inhibitor-Serum v. Kaninchen. Es ist hierbei darauf zu achten, daß die Mischung mit dem Antiserum nicht über 56 °C erhitzt wird, da dieses sonst denaturiert wird. Die Platten werden nun um 90° gegen den Uhrzeigersinn gedreht in die Elektrophoresekammer gelegt. Die zweite Elektrophorese-Phase dauert bei 150 V etwa 18 Std. (über Nacht). Danach sind die Präzipitate des ITI und der beiden Derivate ausgebildet. Nach Trocknung der Agaroseschicht legt man die Platten ca. 20–30 min in ein Färbebad mit Coomassie Brilliant Blue G 250. Die anschließende Entfärbung in der Methanol/Eisessig-Lösung (9:1) sollte nur sehr kurz durchgeführt werden, da bei zu starker Entfärbung die SLD kaum mehr zu erkennen sind.

Mit Hilfe eines Fotoprojektionsapparates wurden die Originalplatten auf Zeichenpapier projiziert. Die planimetrische Flächenauswertung wurde, da ja eine erhebliche Überlagerung der Präzipitate vorlag, unter Zugrundelegung von Gauß'schen Verteilungskurven vorgenommen.

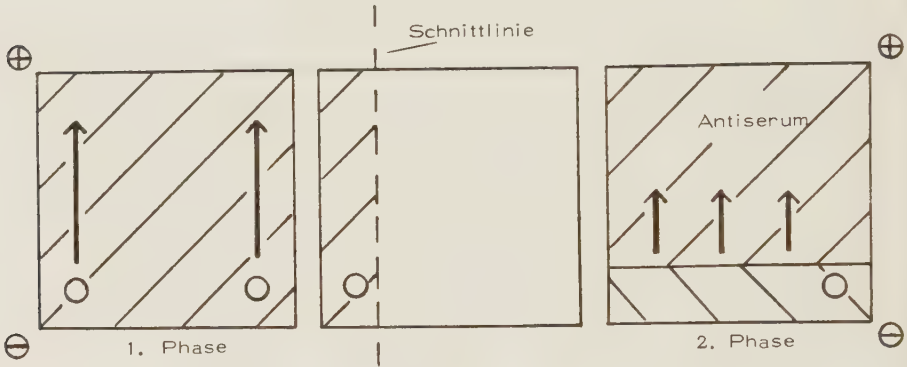


Abb. 18: Skizze zur 2d-ImE.

2.2. Anfertigung der eindimensionalen Immunelektrophorese nach Laurell

Der spezifische Nachweis des ITI erfolgt mit der Elektroimmunodiffusion nach Laurell. (41) Das Antigen hinterläßt bei seiner elektrophoretischen Wanderung im Agarosegel, wenn dieses ein monovalentes Antiserum in gleichmäßiger Verteilung enthält, ein langgestrecktes Immunpräzipitat.

Auf die abgeflamte Glasplatte mit der Größe 10 x 10 cm trägt man eine Mischung von 6 ml 0,2 % Agaroselösung, 6 ml 0,15 M Barbiturattuffer und 250 μ l Anti-ITI-Serum auf, wobei wiederum darauf zu achten ist, daß die Lösung flüssig wird, ohne das Antiserum über 56°C zu erhitzen. In die erstarrte Agaroseschicht stanzt man diesmal mit Hilfe

einer Stanzschablone je nach Bedarf bis zu 16 Löcher mit einem Durchmesser von ebenfalls ca. 2 mm. Als Vergleichswert für die übrigen Seren pipettiert man in das erste Loch 3 μ l Serum von gesunden Probanden. Die restlichen Startlöcher werden ebenfalls mit je 3 μ l der jeweiligen pathologischen Seren gefüllt. An der Elektrophoresekammer legt man eine Spannung von 150 V an. Nach einer Laufzeit von 6 - 8 Std. sind diese Präzipitate bereits voll ausgebildet. Sobald die Agaroseschicht eingetrocknet ist, kann man die Peaks durch ein 20 - 30minütiges Färbebad in Coomassie Brilliant Blue G 250 und anschließende Teilentfärbung gut sichtbar machen. Die Auswertung erfolgte wiederum durch photographische Projektionstechnik. Die Höhe des jeweils mitlaufenden Normalserums wurde bei der Bewertung gleich 1,0 gesetzt und somit eine Abweichung pathologischer Seren von der normalen ITI-Konzentration durch den Höhenunterschied ersichtlich.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Freisetzung des säurestabilen Proteinase-Inhibitors I-30 aus seinem Precursor, dem Inter- α -Trypsininhibitor (ITI), entstehen ein, möglicherweise auch zwei säurelabile Bruchstücke. Diese besitzen noch eine schwache immunologische Kreuzreaktion mit dem ITI.

Die Durchführung der zweidimensionalen Immunelektrophorese mit Anti-Inter- α -Trypsin-Inhibitor-Serum vom Kaninchen ergab bei Seren von gesunden Probanden eine ziemlich einheitliche Verteilung der Präzipitate des ITI und der beiden säurelabilen Derivate (SLD). Bei der Untersuchung von pathologischen Seren bei Patienten mit Leberinsuffizienz, Nephropathien und chron. Niereninsuffizienz, sowie mit Sepsis und Schock, konnte vor allem eine erhebliche Präzipitatvergrößerung des säurelabilen Derivates D₁ gegenüber dem ITI-Präzipitat festgestellt werden. Daß Kallikrein als spezifisches "liberating enzyme" eine Freisetzung des I-30 bewirken kann, wäre infolgedessen durchaus denkbar. Auch bei einer Reihe weiterer, z.T. entzündlicher Erkrankungen sowie etlicher Tumor-Patienten wurde eine solche Verschiebung der Peakgrößen gefunden. Durch dieses vermehrte Auftreten der säurelabilen Derivate in der zweidimensionalen Immunelektrophorese konnte die Vorstellung von einem gesteigerten Abbau des ITI bei verschiedenen pathologischen Zuständen bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

1. ASCOLI M., BEZZOLA G.:
Das Verhalten des antitryptischen Vermögens des Blutserums
bei der croupösen Pneumonie.
Berliner Klin. Wochschr. 40 (1903), S. 391
2. ASTRUP T., STERNDOERF J.:
The plasminogen activator in urine and the urinary trypsin
inhibitor.
Scand. Journ. clin. Lab. Invest. 7 (1955), S. 239
3. ASTRUP T., ALKJAER K., SOARDI F.:
Partial purification of the trypsin inhibitor in urine.
Scand. Journ. clin. Lab. Invest. 11 (1955), S. 181
4. BACK N.:
Fibrinolysin system and vasoactive kinins.
Fed. Proc. 25 (1966), S. 77
5. BECKER W.:
Methoden der qualitativen u. quantitativen Immunelek-
trophorese.
Informationsschrift d. Behringwerke/Marburg (1974)
6. BERALDO W.T.:
Formation of bradykinin in anaphylactic and peptone shock.
Am. Journ. Physiol. 163 (1950), S. 283
7. BRETZEL G., HOCHSTRASSER K.:
Liberation of an acid stable proteinase inhibitor from the
human inter- α -trypsin inhibitor by the action of kallikrein.
Hoppe Seyl. Zschr. Physiol. Chem. 357 (März 1976), S. 487
8. BUDDECKE E.:
Grundriß der Biochemie.
Verl.: W. de Gruyter, New York (1974)
9. BULUK K., MALOFIEJEV M.:
Urokinase-induced activation of kallikreinogen and the
release of plasma kinins in renal blood.
Acta med. Polona 6 (1965), S. 405

10. CLARKE M.H.G., FREEMAN T.:
Quantitative immunoelektrophoresis of human serum
proteins.
Clin. Science 35 (1968), S. 403
11. DONALDSON V.H., EVANS P.R.:
A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema.
Am. Journ. Med. 35 (1963), S. 37
12. EISEN V.:
Fibrinolysis and biologically active polypeptides.
Brit. med. Bull. 20 (1964), S. 205
13. EISNER G.:
Untersuchungen über die anti fermentative, besonders die
antitryptische Wirkung des Blutserums.
Zschr. f. Immunitätsforschung, Orig. I (1908/09), S. 650
14. ERIKSSON S.:
Studies in α_1 -antitrypsin deficiency
Acta med. Scand. 117. (1965), Suppl. S. 175
15. FERMI C., PERNOSSI L.:
Über die Enzyme.
Zschr. f. Hygiene 18 (1894), S. 83
16. FEUTH H., KEMKES B., HOCHSTRASSER K.:
Frühzeitige Erkennung einer Abstoßungskrise nach Nieren-
transplantation durch Bestimmung eines niedermolekularen
Proteasen-Inhibitors im Serum und Harn.
Langenbecks Arch. Chir. Suppl.-Chir. Forum 1975, S. 133
17. FREY E.K., KRAUT H., WERLE E.:
Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren.
Verl.: F. Enke, Stuttg. (1968)
18. GANROT P.O., BJERRE B.:
 α_1 -Antitrypsin and α_2 -macroglobulin concentration in
serum during pregnancy .
Acta obst. gyn. scand. 46 (1967), S. 126
19. GANROT P.O., SCHERSTEN B.:
Serum α_2 -macroglobulin concentration and its variation
with age and sex.
Clin. Chim. Acta 15 (1967), S. 113

20. GRÄFENBERG E.:
Der Antitrypsingehalt des mütterlichen Blutserums
während der Schwangerschaft.
Münch. med. Wochr. 56 (1909), S. 702
21. GROSS R., SCHÖLMERICH P.:
Lehrbuch d. Inneren Medizin.
Verl.: Schattauer, Stuttg. (1976)
22. HEDIN S.G.:
On the presence of a proteolytic enzyme in the normal
serum of the ox.
Journ. Physiol. 30 (1903), S. 195
23. HEIDE K., HEIMBURGER N., HAUPT H.:
A inter- α -trypsin inhibitor of human serum.
Clin. Chim. Acta 11 (1965), S. 82
24. HEIMBURGER N., SCHWIECK H.G.:
Die Fibrinagar-Elektrophorese.
I. Mitteilung: Beschreibung der Methode (nach 27)
25. HEIMBURGER N., HAUPT H.:
Zur Spezifität der Antiproteinasen des Humanplasmas
für Elastase.
Klin. Wochr. 44 (1966), S. 1196
26. HEIMBURGER N.:
XII. Symposium über Blutgerinnung (nach 27)
27. HEIMBURGER N., HAUPT H., SCHWIECK H.G.:
Proteinase inhibitors of human plasma.
in: Proceedings of the Int. Research Conference on Pro-
teinase Inhibitors - Munich, Nov. 1970
Hersg.: Fritz H., Tschesche H.
Verl.: W. de Gruyter, Berlin (1971)
28. HOCHSTRASSER K., FEUTH H., STEINER O.:
Zur Charakterisierung der säurestabilen Proteinase-
inhibitoren aus Humanplasma.
Hoppe Seyl. Zschr. Physiol. Chem. 354 (Aug. 1973), S. 927
29. HOCHSTRASSER K., FEUTH H., FALL J., KEMKES B.:
Säurestabile Proteinaseinhibitoren im Blutplasma bei
verschiedenen Nephropathien.
Klin. Wochr. 52 (1974), S. 1015

30. HOCHSTRASSER K., FEUTH H., KEMKES B., FALL J.,
WERLE E.:
Das Verhalten der säurestabilen Proteinaseinhibitoren
im Serum und Harn nach Nierentransplantationen.
Klin. Wochr. 52 (1974), S. 1018
31. HOCHSTRASSER K., BRETZEL G., FEUTH H., HILLA W.,
LEMPART K.:
The inter- α -trypsin inhibitor as precursor of the acid-stable
proteinase inhibitors in human serum and urine.
Hoppe Seyl. Zschr. Physiol. Chem. 357 (Feb. 1976), S. 153
32. JACOBSSON K.:
The quantitative determination of trypsin inhibitors in
pathological sera.
Scand. Journ. clin. Lab. Invest. 7 (1953) Suppl. 14, S. 83
33. JANOFF A.:
Mediators of tissue damage in leukocyte lysosomes.
Lab. Invest. 22 (1970), S. 228
34. KARLSON P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Verl.: Thieme, Stuttg. (1974)
35. KAZAL L.A., SPICER D.S., BRAHINSKY R.A.:
Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-antico-
agulant protein from pancreas.
Journ. Am. Chem. Soc. 70 (1948), S. 3034
36. KEMP J.H., JOHNSTONE J.M.:
Evaluation of serum trypsin inhibitor activity in the
detection of malignant disease.
Brit. Journ. Cancer 18 (1964), S. 390
37. KUEPPERS F.:
Genetically determined differences in the response of
alpha₁-antitrypsin levels in human serum to typhoid
vaccine.
Humangenetik 6 (1968), S. 207
38. KUNITZ M., NORTHROP J.H.:
Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen,
trypsin, a trypsin inhibitor and an inhibitor-trypsin
compound.
Journ. Gen. Physiol. 19 (1936), S. 991

39. LANDSTEINER K.:
Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe.
Zt. bl. Bakt., I. Abt. Orig. 27 (1900), S. 357
40. LAURELL C.B.:
Antigen-antibody crossed electrophoresis.
Anal. Biochem. 15 (1965), S. 358
41. LAURELL C.B.:
Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.
Anal. Biochem. 15 (1966), S. 45
42. LAURELL C.B., ERIKSSON S.:
The electrophoretic α_1 -globulin pattern of serum in α_1 -antitrypsin deficiency.
Scand. Journ. clin. Lab. Invest. 15 (1963), S. 132
43. PASKHINA T.S., KRINSKAYA A.V.:
Vop.med. Khim. 20 (1974), S. 660
44. PEANASKY R.J., LASKOWSKY M.:
Partial purification of the trypsin inhibitor from blood plasma.
Journ. Biol. Chem. 204 (1953), S. 153
45. PROKSCH G.J., NORDSCHOW C.D.:
Intersoc., 261
46. ROCHA E SILVA M., HOLZHACKER E.L.:
Arch. int. Pharmacodyn. 122 (1959), S. 168
47. ROCHA E SILVA M., ROSENTHAL S.R.:
Release of pharmacologically active substances from the rat skin in vivo following thermal injury.
Journ. Pharmacol. Exp. Therapy 132 (1961), S. 110
48. ROSEN F.S., CHARACKE P., PENSKY J., DONALDSON V.:
Hereditary angioneurotic edema: two genetic variants.
Science 148 (1965), S. 957
49. SHARP A.A.:
Pathological fibrinolysis.
Brit. med. Bull. 20 (1964), S. 240

50. SHULMAN N.R.:
A proteolytic inhibitor with anticoagulant activity
separated from human urine and plasma.
Journ. Biol. Chem. 213 (1955), S. 655
51. SCHÖN H., RÄSSLER B., ALTER J.:
Untersuchungen über die Trypsin-Inhibitor-Kapazität des
menschlichen Serums.
Clin. Chim. Acta 7 (1962), S. 571
52. SCHULTZE H.E., HEIDE K., HAUPT H.:
 α_1 -Antitrypsin aus Humanserum.
Klin. Wochschr. 40 (1962), S. 427
53. SCHUSTER R.:
Med. Dissertation, LMU-München (1974)
54. SCHWIECK H.G., HEIMBURGER N.:
12. Tagung d. Dt. Arbeitsgemeinschaft f. Blutgerinnungs-
forschung - Deidesheim, 1968 (nach 27)
55. STEINBUCH M.:
Nature (London), 192 (1961), S. 1196
56. STEPHAN W., FRAHM K.:
Quantitative Immunelektrophorese - Eine Mikromethode
zur Routinebestimmung der Serumproteine.
Zt. klin. Chem. u. klin. Biochem. 5, 8. Jg. (Sept. 1970), S. 469
57. THAL A.P.:
The release of vasoactive substances in active pancreatitis.
Am. Journ. of Surgery (Jun. 1963), S. 708
58. TISOWSKY N.U.:
Über die Beziehungen der niedermolekularen Serum-inhibitoren
und des Inter- α -Trypsin-inhibitors zu den niedermolekularen
Proteinasen-inhibitoren aus dem Sekret des oberen Respirations-
traktes.
Med. Dissertation, LMU-München (1975)
59. VOGEL R., TRAUTSCHOLD I., WERLE E.:
Natürliche Proteinase Inhibitoren.
Verl.: Thieme, Stuttg. (1966)

60. VOGT W.:
Kinin formation by plasmin, mediated by activation
of kallikrein.
Journ. Physiol. 169, Soc. 12-13 (Jul. 1963), S. 45 P
61. VOGT W.:
Kinin formation by plasmin, an indirect process mediated
by activation of kallikrein.
Journ. Physiol. 170 (1963), S. 153
62. WERLE E., VOGEL R.:
Über die Freisetzung einer kallikreinartigen Substanz aus
Extrakten verschiedener Organe.
Arch. int. Pharmacodyn. 131 (1961), S. 257
63. WERLE E.:
in: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, S. 176
Hersg.: Gross R., Kroneberg G.
Verl.: Schattauer, Stuttg. (1966)
64. WIENS T.:
Über die Antifermentreaktion des Blutes und ihre Beziehungen
zur organischen Kraft bei akuten Infektionskrankheiten.
Münch. med. Woschr. 23 (1907), S. 2637
65. WONG P., COLMAN R.W., TALAMO R.C., BABIOR B.M.:
Kallikrein-bradykinin system in chronic alcoholic liver
desease.
Ann. Int. Med. 77 (1972), S. 205

Danksagung

Dank sagen möchte ich Herrn Prof. Dr. H. H. Naumann für die großzügige Bereitstellung des Arbeitsplatzes; Herrn Dr. J. Niebel für die Beschaffung der verschiedenen Patientenseren, Frl. K. Lempart, Frl. Rossmannith und Frau Heindl für die labortechnische Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Hochstraßer für die Überlassung des Themas sowie für seine stets freundliche Art, mit der er mir bei der Bearbeitung mit Rat und Tat zur Seite stand.

Lebenslauf

Als erster Sohn des Arztes Dr. Maximilian Deiler und seiner Ehefrau Dr. Helga Deiler, geb. Gietl, wurde ich am 10. September 1954 in München geboren. Hier verbrachte ich meine frühen Kindheitsjahre sowie meine Volksschulzeit von 1960 bis 1964. Danach besuchte ich von 1964 bis 1973 das hum. St. Michaels Gymnasium der Benediktiner zu Metten. Nach bestandener Reifeprüfung begann ich im WS 1973/74 an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Studium der Humanmedizin. Im Sommer 1975 unterzog ich mich der Ärztlichen Vorprüfung. Mit dem experimentellen Teil der Dissertationsarbeit begann ich ungefähr ein halbes Jahr später, im Januar 1976, im Biochemischen Laboratorium der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität München.

